

**FAKULTA
STROJNÍ
ČVUT V PRAZE**

Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky
Odbor biomechaniky

Vliv kryoprezervace na mechanické vlastnosti arteriálních štěpů

Effect of cryopreservation on mechanical
properties of arterial grafts

Bakalářská práce

2022

Jiří FENCL

Studijní program: Teoretický základ strojího inženýrství

Vedoucí práce: Ing. Hynek Chlup, Ph.D.

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Fencel** Jméno: **Jiří** Osobní číslo: **491494**
Fakulta/ústav: **Fakulta strojní**
Zadávací katedra/ústav: **Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky**
Studijní program: **Teoretický základ strojního inženýrství**
Studijní obor: **bez oboru**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Vliv kryoprezervace na mechanické vlastnosti arteriálních štěpů

Název bakalářské práce anglicky:

Effect of cryopreservation on mechanical properties of arterial grafts

Pokyny pro vypracování:

Seznamte se s mechanickými vlastnostmi cév, cévních náhrad, technikami kryoprezervace a možným vlivem na vlastnosti měkkých tkání.

Zpracujte experimentální data a analyzujte charakteristiky s ohledem na: vliv kryoprezervace, vliv rychlosti rozmrazení tepenných štěpů, vliv získání vzorků z kadaverů a z multiorgánových odběrů.

Seznam doporučené literatury:

Špaček M, Měřička P, Janoušek L, Štádlér P, Adamec M, Vlachovský R, Guňka I, Navrátil P, Thieme F, Špunda R, Burkert J, Staffa R, Němec P, Lindner J. Current vascular allograft procurement, cryopreservation and transplantation techniques in the Czech Republic. Adv Clin Exp Med. 2019 Apr;28(4):529-534. doi: 10.17219/acem/90037. PMID: 30684317.
Venkatasubramanian RT, Grassl ED, Barocas VH, Lafontaine D, Bischof JC. Effects of freezing and cryopreservation on the mechanical properties of arteries. Ann Biomed Eng. 2006 May;34(5):823-32. doi: 10.1007/s10439-005-9044-x. Epub 2006 Apr 18. PMID: 16619131.

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) bakalářské práce:

Ing. Hynek Chlup, Ph.D. odbor biomechaniky FS

Jméno a pracoviště druhé(ho) vedoucí(ho) nebo konzultanta(ky) bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: **17.04.2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **14.08.2022**

Platnost zadání bakalářské práce: _____

Ing. Hynek Chlup, Ph.D.
podpis vedoucí(ho) práce

prof. Ing. Michael Valášek, DrSc.
podpis vedoucí(ho) ústavu/katedry

doc. Ing. Miroslav Španiel, CSc.
podpis děkana(ky)

III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

Student bere na vědomí, že je povinen vypracovat bakalářskou práci samostatně, bez cizí pomoci, s výjimkou poskytnutých konzultací. Seznam použité literatury, jiných pramenů a jmen konzultantů je třeba uvést v bakalářské práci.

_____ Datum převzetí zadání

_____ Podpis studenta

Anotační list

<i>Jméno autora</i>	Jiří Fencel
<i>Název</i>	Vliv kryoprezervace na mechanické vlastnosti arteriálních štěpů
<i>Název v angličtině</i>	Effect of cryopreservation on mechanical properties of arterial grafts
<i>Akademický rok</i>	2021/2022
<i>Studijní program</i>	Teoretický základ strojního inženýrství
<i>Ústav</i>	Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky, odbor biomechaniky
<i>Vedoucí práce</i>	Ing. Hynek Chlup, Ph.D.
<i>Bibliografické údaje</i>	počet stran: 64 počet obrázků:43 počet tabulek 3 počet příloh: 0
<i>Klíčová slova</i>	kryoprezervace, cévní náhrada, alotransplantát, tepenný štěp, inflačně-extenzní test, mechanická odezva, anizotropie
<i>Keywords</i>	cryopreservation, vascular replacement, allotransplant, arterial graft, inflation-extension test, mechanical characteristics, anisotropy

Abstrakt

Tato práce zkoumá vliv kryoprezervace na mechanickou odezvu arteriálních štěpů využívaných jako cévní náhrady. Vzorky tepen byly cyklicky zatěžovány vnitřním tlakem pomocí inflačně-extenzních testů. Byly získány a porovnány charakteristiky dvou skupin kryoprezervovaných arteriálních štěpů, lišící se způsobem rozmrazení: pomalu rozmražené (dle standardního protokolu TÚ FNHK, tedy přibližně po dobu 120 minut) a rychle rozmražené (po dobu 5 minut ve vodní lázni). Testovány byly také dvě skupiny nativních vzorků tepen: skupina získaná při multiorgánových odběrech, skupina vzorků odebraných z kadaveru. Zkoumáno bylo celkem 32 vzorků od 32 dárců tj. – 10 rychle rozmražených, 8 pomalu rozmražených, 5 vzorků z multiorgánových odběrů a 9 vzorků z kadaverů. Vzorky byly nejprve cyklicky zatěžovány kvazistaticky, poté cyklovány vyšší frekvencí a nakonec opět kvazistaticky. Vyhodnocovány a porovnány byly charakteristiky všech uvedených skupin arterií získané ze zatěžující části 8. a 65. cyklu kvazistatického zatěžování. S ohledem na mechanickou odezvu při zatěžování byl vyhodnocen vliv kryoprezervace, rychlosti rozmrazení a typu odběru nativních vzorků. Zkoumán byl i vliv násobného cyklického zatěžování. Pro výpočet napětí byla využita teorie tenkostěnných válcových skořepin. Porovnání závislosti napětí-deformace bylo provedeno ve směru obvodovém i axiálním. Ze získaných charakteristik je zjevné, že všechny skupiny vzorků se v obvodovém směru deformují více než v axiálním. Zásadním poznatkem této práce je, že kryoprezervace má vliv na nárůst poddajnosti arteriální stěny v obvodovém i axiálním směru. Především v axiálním směru jsou deformace kryoprezervovaných vzorků znatelně větší v porovnání s nativními vzorky. Kryoprezervace má zřejmě vliv na změnu struktury arteriální stěny. Tyto změny se projeví poklesem míry anizotropie. Vliv cyklického zatěžování je patrný u kryoprezervovaných vzorků – především u rychle rozmražených, které se stávají poddajnějšími. Kryoprezervované vzorky vykazují podobné charakteristiky při zatěžování přibližně do hodnoty diastolického tlaku. Při vyšším zatížení se rychle rozmražené vzorky deformují více. Nativní tepny z kadaverů tuhnou při vyšším zatížení rychleji než vzorky z multiorgánových odběrů. Nativní vzorky z multiorgánových odběrů a pomalu rozmražené vzorky vykazují nad hodnotou diastolického tlaku podobnou odezvu, tj. trendy – směrnice charakteristik jsou podobné.



Abstract

This thesis deals with the effect of cryopreservation on mechanical properties of arterial allografts used for vascular replacements. Arterial specimens were loaded cyclically by internal pressure during inflation-extension tests. Mechanical characteristics of two groups of cryopreserved arterial grafts with different thawing protocol were obtained and compared: slow-thawed grafts (according to standard thawing protocol TU FNHK – 120 minutes in refrigerator) and rapid-thawed (5 minutes in water bath at 37 °C). Two groups of fresh allografts were also tested: grafts from multiorgan harvest and grafts from cadavers. There were 32 grafts from 32 donors tested in total – 10 rapid-thawed, 8 slow-thawed, 5 from multiorgan harvest and 9 cadaverous. All grafts were tested with quasistatic loading, then with higher loading frequencies and with quasistatic loading again at the end. The mechanical characteristics from 8. and 65. cycle of quasistatic loading were examined and compared between all four groups of grafts. The effect of cryopreservation, different thawing protocol and effect of different source of fresh grafts was examined as well as effect of cyclic loading. The theory of thin-walled structures was used to calculate stress in arterial wall during testing. Mechanical stress-strain characteristics were compared in both circumferential and axial direction. The results are that circumferential deformations in all groups of grafts are higher than in axial direction. One of the main findings is that cryopreservation has effect on increase of arterial wall deformation in circumferential and axial direction. Especially in axial direction the deformations are significantly higher in comparison with fresh allografts. Cryopreservation probably causes some changes in structure of arterial wall which results in anisotropy decrease. The effect of cyclic loading can be seen on cryopreserved graft group, mainly the rapid-thawed grafts report higher deformations. Both cryopreserved graft group have similar mechanical characteristics until the diastolic pressure level. Rapid-thawed grafts tend to deform more above this pressure level. Cadaverous fresh grafts tend to be stiffer with higher stresses than fresh grafts from multiorgan harvest. Fresh grafts from multiorgan harvest and slow-thawed grafts have similar mechanical characteristics above the diastolic pressure level – trends of characteristics are similar.

Poděkování

Za věnovaný čas, odborné rady s přesahem a konstruktivní kritiku děkuji svému vedoucímu Ing. Hynku Chlupovi, Ph.D.

Děkuji své rodině za podporu nejen ve studiu.



Obsah

1	Seznam použitých symbolů a zkratk	10
2	Úvod	12
3	Cíle práce	13
4	Cévní náhrady	14
5	Zatěžování cév v lidském těle a struktura cévní stěny	17
5.1	Struktura cévní stěny	18
5.2	Mechanické vlastnosti tepen	22
6	Kryoprezervace cév	26
6.1	Kryoprezervace cév v ČR	28
7	Mechanické testování cév	30
8	Teorie tenkostěnných nádob – skořepin	36
9	Experimentální část	39
9.1	Vzorky	39
9.2	Testování a jejich vyhodnocení	42
10	Výsledky	49
11	Diskuze	53
12	Závěr	57
13	Dodatek	59
14	Seznam obrázků	65
15	Seznam tabulek	68
16	Literatura	69

1 Seznam použitých symbolů a zkratek

Značka	Jednotka	Popis
p	[kPa]	Vnitřní tlak ve vzorku
σ	[kPa]	Cauchyho napětí
σ_c, σ_a	[kPa]	Cauchyho napětí v obvodovém, axiálním směru
$\sigma_{1,2}$	[kPa]	Cauchyho napětí ve dvou kolmých směrech
ε	[-]	Deformace
$\varepsilon_c, \varepsilon_a$	[-]	Deformace v obvodovém, axiálním směru
$\lambda_c, \lambda_a, \lambda_r$	[-]	Streč v obvodovém, axiálním a radiálním směru
F, F_x, Q	[N]	Vnější silový účinek
$F_{1,2}$	[N]	Vnější silový účinek ve dvou kolmých směrech
R	[mm]	Referenční poloměr vzorku
r	[mm]	Okamžitý poloměr vzorku, při zatížení
$L, L_{1,2}$	[mm]	Referenční délka vzorku, délka ve dvou kolmých směrech
$l, l_{1,2}$	[mm]	Okamžitá délka vzorku, při zatížení, délka ve dvou kolmých směrech
D	[mm]	Referenční průměr vzorku
d	[mm]	Okamžitý průměr vzorku, při zatížení
H	[mm]	Referenční tloušťka vzorku
h	[mm]	Okamžitá tloušťka vzorku, při zatížení
R_m, R_i, R_e	[mm]	Střední, vnitřní a vnější poloměr vzorku
D_m	[mm]	Střední průměr vzorku
O	[mm]	Střední obvod vzorku
α	[°]	Úhel rozevření kroužku vytnutého z cévního štěpu
$R_{1,2}$	[mm]	Poloměry křivosti ve dvou kolmých směrech
S	[mm ²]	Průřez stěny cévního štěpu



Zkratka	Popis
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice v Praze
TÚ FNHK	Tkáňová ústředna Fakultní nemocnice Hradec Králové
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice Praha
VSM	Vena saphnena magna
HGO	Hyperelastický model Holzapfel, Gasser, Ogden
GOH	Hyperelastický model Gasser, Ogden, Holzapfel
PTFE	Polyterafluorethylen (teflon)
CPA	Kryoprotektanty (cryoprotective agents)
RD	Rychle rozmrazené kryoprezervoané štěpy
PD	Pomalou rozmrazené kryoprezervoané štěpy
Multi	Nativní štěpy z multiorgánových odběrů
Kad	Nativní štěpy z kadaverů

2 Úvod

Onemocnění kardiovaskulárního systému jsou celosvětově nejčastější příčinou úmrtí [1]. Mezi onemocněním cév patří především ateroskleróza, tromboembolická choroba nebo varixy. V případě pokročilého onemocněním cév, kdy postižení již není možné efektivně léčit medikamenty nebo intervenční léčbou, je potřeba použít chirurgickou léčbu – implantaci cévní náhrady. Vedle revaskularizace postiženého místa cévním štěpem přímo z těla pacienta a vedle umělých cévních náhrad je pro své příznivé výsledky užívána možnost biologických cévních náhrad od dárců, tzv. alotransplantáty. Pro uskladnění cévních štěpů po vyoperování tak, aby mohly být použity v požadovaný čas, je využívána metoda kryoprezervace.

Kryoprezervace cév je uchování cévních štěpů při teplotách hluboko pod bodem mrazu, kdy jsou téměř pozastaveny metabolické a chemické procesy v biologickém materiálu a dochází k účinné konzervaci. Takto konzervované cévní štěpy mohou být skladovány v řádu několika let až do doby opětovného rozmrazení a implantace. Lze tak vytvořit tkáňovou banku, pomocí které je možné uspokojit poptávku po anatomicky a geometricky rozličných cévních štěpech téměř okamžitě. V České republice jsou kryoprezervované štěpy užívány v lékařské praxi od roku 2011, jedná se tak o poměrně novou a progresivní variantu cévních náhrad u nás.

Komplikací při kryoprezervaci mohou být vznikající krystalky ledu při zmrazování a rozmrazování, které narušují strukturu cévní stěny. To má poté vliv na změnu mechanických vlastností kryoprezervovaných štěpů oproti nativním štěpům a může vést ke špatné funkci štěpů při zatížení v krevním řečišti. Ačkoli je metoda kryoprezervace cév dlouho známá a ve světě užívaná, stále nebyl optimalizován způsob zmrazení a rozmrazení natolik, aby nedocházelo k poškození morfologicky rozmanité tkáně cévní stěny. Zůstává tak v této oblasti místo pro výzkum, popis a optimalizaci použitých metod kryoprezervace.

Tato práce je součástí dlouhodobého výzkumu kryoprezervovaných cévních náhrad, který probíhá v rámci spolupráce laboratoře biomechaniky Fakulty strojní ČVUT s VFN v Praze a s TÚ FNHK. V předchozích pracích byl prověřován vliv kryoprezervace na mechanické vlastnosti žilních štěpů (konkrétně VSM). V této práci je zkoumána mechanická odezva kryoprezervovaných tepenných štěpů. Mechanické charakteristiky tepenných vzorků jsou získány experimentálně provedením inflačně-extenzních testů. Zkoumán je vliv rychlosti rozmrazení (pomalý a rychlý způsob) a vliv kryoprezervace – mechanické charakteristiky kryoprezervovaných vzorků jsou porovnány s charakteristikami nativních vzorků. Výsledky získané zkoumáním kryoprezervovaných tepenných štěpů pak mohou být porovnány s výsledky u kryoprezervovaných žilních štěpů z přechozích prací.



3 Cíle práce

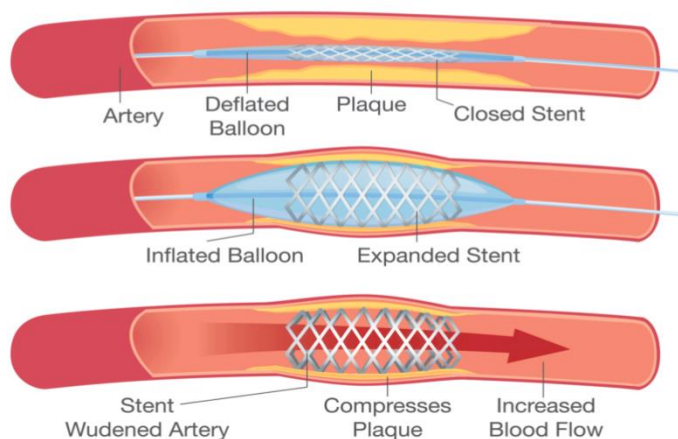
Tato bakalářská práce se zabývá mechanickými vlastnostmi kryoprezervovaných a čerstvých tepenných štěpů. Mezi hlavní cíle této práce patří:

- seznámit se s mechanickými vlastnostmi cév a cévních náhrad
- seznámit se s technikami kryoprezervace a možným vlivem na vlastnosti měkkých tkání, především tepen
- zpracovat experimentální data a analyzovat charakteristiky s ohledem na vliv kryoprezervace, vliv rychlosti rozmrazení tepenných štěpů, vliv získání nativních vzorků z multiorgánových odběrů a z kadaverů.

4 Cévní náhrady

Společným jmenovatelem kardiovaskulárních onemocnění je ateroskleróza – zúžení tepen vlivem nadměrného ukládání tuků v cévní stěně (konkrétně ve vrstvě zvané tunica intima), které má za následek zúžení neboli stenózu, nebo až zneprůchodnění tepen. Při zúžení cév může docházet k nedokrvení orgánů (ischemii) nebo celých částí těla. Může také docházet ke vzniku sraženin (trombů) v místě postižení cévní stěny. Sraženiny se mohou odtrhnout (vznik embolie) a způsobit zneprůchodnění cév v životně důležitých orgánech. Ischemie se může často vyskytnout v cévách dolních končetin. Pokud se ateroskleróza vyskytuje ve věnčitých tepnách, které zásobují krví srdeční sval, jedná se o ischemickou chorobu srdeční, která může v krajním případě vyústit v infarkt myokardu. Ischemie v mozkových cévách může mít za následek cévní mozkovou příhodu. Ateroskleróza může způsobit narušení cévní stěny a zeslabení tunicy medie, což může vést ke vzniku výdutě (aneurysmatu), nebo až k ruptuře cévní stěny. Mezi hlavní rizikové faktory vzniku aterosklerózy patří obezita, kouření, zvýšená hladina cholesterolu nebo hypertenze [2, 3].

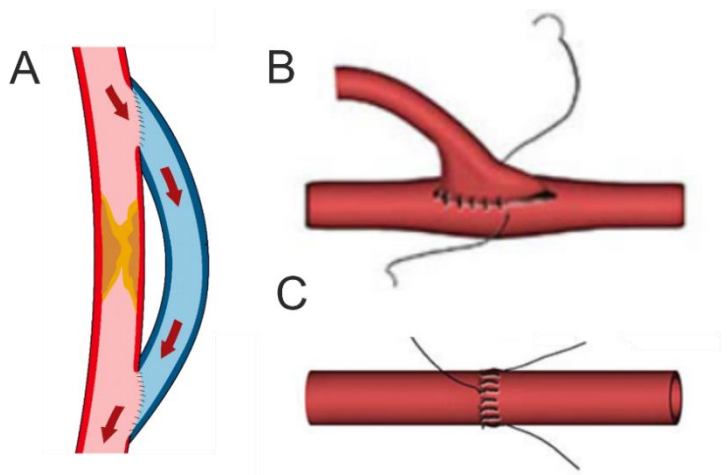
V rámci intervenční léčby stenózy cév lze použít tzv. angioplastika. Tato intervenční metoda spočívá v zavedení katetru, na jehož konci je balónek, do zúženého místa cévy. Balónek je nafouknut a tím dochází k zprůchodnění průtočného průřezu cévy. Součástí balonkového katetru může být i tzv. stent, který po expanzi balonku zůstává ve zúženém místě cévy a má funkci výztuhy, viz Obrázek 1.



Obrázek 1 – Znáznornění procesu balonkové angioplastiky s aplikací stentu [4]

V případě pokročilejší nebo rozsáhlejší aterosklerózy je použita invazivnější chirurgická metoda – bypass neboli přemostění postiženého místa cévního řečiště cévní náhradou, viz Obrázek 2.A. Přestože je metoda bypassu historicky starší a je metodou náročnější pro tělo pacienta, je stále používána v četných případech zprůchodnění věnčitých tepen nebo tepen dolních končetin [3, 5]. Bypass pak lze provést napojením cévní náhrady na cévu pacienta (cévní anastomózu) spojením tzv. end-to-side, tedy přemostěním postiženého místa, viz Obrázek 2.B. V tomto případě je potřeba dbát na správný úhel napojení cévní náhrady –

ten se liší pro jednotlivé případy a délky náhrad. Nevhodně zvolený úhel napojení může být příčinou budoucích komplikací. V případě vyoperování postižené části cévy a nahrazením tohoto úseku cévní náhradou jde o spojení end-to-end, viz Obrázek 2.C. Při tomto napojení je potřeba dbát především na shodný průměr cévní náhrady s cévou pacienta [2].



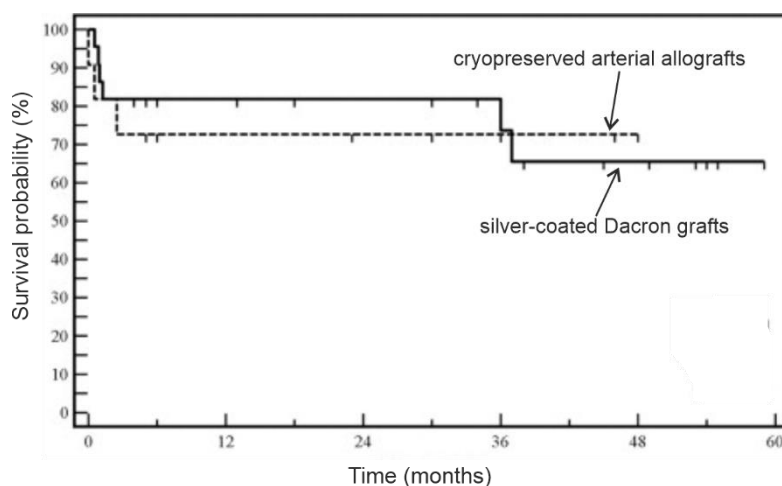
Obrázek 2 – Metoda bypassu; A – schematické znázornění přemostění postižené oblasti; B – napojení cévní náhrady end-to-side; C – napojení cévní náhrady end-to-end [6]

Zlatým standardem pro cévní náhrady jsou **biologické cévní náhrady**, konkrétně autotransplantáty – cévní štěpy pocházející přímo z těla pacienta. Pro bypass věnčitých tepen je preferována tepna a. thoracica interna, a. radialis nebo vena saphena magna (VSM). V případě dolních končetin je preferovanou volbou pro cévní náhrady VSM. Využitím autotransplantátu je výrazně snížena imunitní reakce organismu a cévní náhrada tak zůstává dlouhodobě velmi dobře průchozí [2, 3]. V některých případech je však cévní onemocnění natolik pokročilé, že je jím zasažen celý vaskulární systém pacienta a není tak možné použít autotransplantát. Jako cévní náhrada se pak dá využít cévní štěp od cizího člověka – dárce, tzv. alotransplantát nebo umělá cévní náhrada.

Jako alotransplantát mohou být použity tepny a cévy tzv. čerstvé, které jsou získány z multiorgánových odběrů či z kadaverů. Takové alotransplantáty musejí být uschovány při nízkých teplotách a implantovány do 48 hodin od odběru. K dlouhodobému uchování alotransplantátů při velmi nízkých teplotách (-196 °C) slouží metoda kryoprezervace (viz kapitola 6). Kryoprezervované cévní štěpy lze uchovat řádově po dobu několika let v tkáňové bance. Vytvořením portfolia cévních štěpů v tkáňové bance tak vzniká možnost plnění poptávky po konkrétním typu biologické cévní náhrady. Problémem u alotransplantátů obecně může být imunologická reakce organismu pacienta. K potlačení imunologické reakce je tak potřeba aplikovat imunosupresivní léčbu. Tato silná reakce byla zaznamenána především u čerstvých alotransplantátů. Kryoprezervované cévní štěpy vykazují mnohem slabší imunní reakci organismu a trombogenecitu, pravděpodobně také díky použití kryoprezervačních činidel [7]. Hlubokým zmrazením a rozmrazením však může docházet k narušení struktury cévní stěny, což může mít negativní vliv

Cévní náhrady/Zatěžování cév v lidském těle a struktura cévní stěny

na mechanické vlastnosti cévní náhrady a v krajním případě vyústit v ruptury cévní stěny. Změnou mechanických vlastností tepenných alotransplantátů vlivem kryoprezervace se zabývá tato práce. Zvláštním případem alotransplantátů jsou xenotransplantáty – cévní náhrady získané ze zvířat. Tento typ náhrad je méně často užívaný, především kvůli silné imunitní reakci lidského organismu po transplantaci.



Obrázek 3 – Porovnání pravděpodobnosti přežití a výskytu neprůchodnosti cévních náhrad – kryoprezervované tepenné alotransplantáty a umělé cévní náhrady z materiálu Dacron [8], upraveno

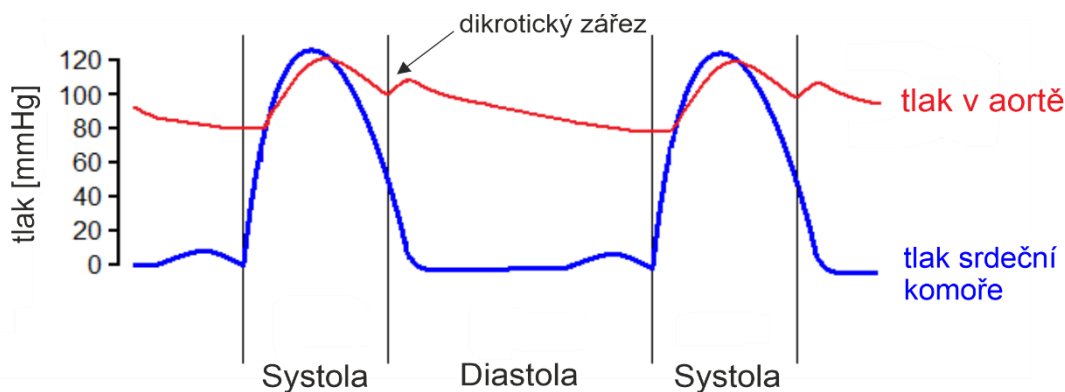
Umělé cévní náhrady jsou vyrobeny nejčastěji z polyesterů Dacronu a teflonu (PTFE, Gore-Tex). Protézy mohou být vyrobeny metodou tkaní, pletení a lití. Jelikož jsou průmyslově vyráběny, jejich získání je snazší než u biologických náhrad. Mezi nevýhody patří především odlišné mechanické vlastnosti náhrady oproti původní cévě. Při našití náhrady tak může docházet ke vzniku místních napětí a remodelaci cévy. Syntetický materiál je také náchylnější ke vzniku trombózy a průchodnost takové náhrady rychle klesá v čase, viz Obrázek 3. Z dlouhodobého hlediska jsou umělé náhrady vhodné pro cévy větších průměrů (>8 mm), kde je trombogenecita překonána větším průtokem krve. Umělé náhrady však nejsou vhodné pro cévy menších průměrů (<6 mm), u kterých výskyt trombózy zapříčiňuje až úplné zneprůchodnění. Pro cévy menších průměrů je tak preferováno využití biologických cévních náhrad, které vykazují dlouhodobě lepší průchodnost při užití imunosupresiv [2, 3]. Při nutnosti transplantace infikovaných umělých náhrad mohou být použity kryoprezervované alotransplantáty s velmi dobrými výsledky [7]. Pokročilejší umělou náhradou jsou tzv. sendvičové cévní protézy. Taková protéza se skládá zpravidla ze tří vrstev. Prostřední vrstva je tzv. scaffold (lešení) je povětšinou vyroben z polyesteru a zajišťuje tuhost protézy. Scaffold je z obou stran potažený maticí z biologického materiálu, která zajišťuje lepší biokompatibilitu. Matrice na vnější straně poskytuje lepší vlastnosti při vhojení náhrady. Vnitřní strana scaffoldu je pokryta endotelovými buňkami, které snižují trombogenecitu náhrady. Výroba takové umělé náhrady je však časově náročná a je tedy nevhodná pro urgentní transplantace [2].

5 Zatěžování cév v lidském těle a struktura cévní stěny

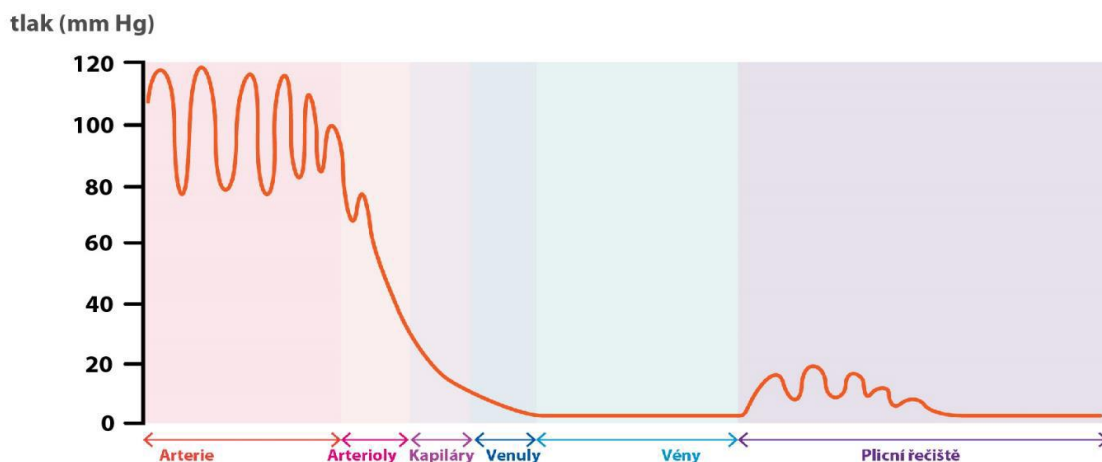
Cévy tvoří v lidském těle soustavu trubic, které rozvádí krev. Jsou cyklicky zatěžovány vnitřním tlakem. Ten je generován prouděním krve způsobeným pulsací srdce. Cévy dělíme na tepny, které rozvádí okysličenou krev ze srdce do těla (od aorty, arterie, arterioly až po kapiláry) a v případě plicní cirkulace rozvádí krev zbavenou kyslíku plicní tepnou do plic. A dále cévy dělíme na žíly, které vedou krev zbavenou kyslíku z tkání zpět do srdce (od kapilár, venuly, vény až po véna cava), v případě plicního oběhu vedou plicní žíly krev bohatou na kyslík zpět do srdce.

Srdce zdravého člověka provede v průměru 60–80 srdečních cyklů za minutu. Při takové srdeční frekvenci je do cévního systému srdcem pumpováno asi 5 litrů krve za minutu, během jednoho srdečního cyklu je pak ze srdce vypuzeno asi 70 ml krve. Určující pro zatížení cév je vnitřní tlak, který je vyvolán vytačením krve ze srdce. Při stahu komor srdce a vypuzení krve z komor do tepen jde o tzv. systolu. Systolický tlak je horní hranicí pracovního zatížení cév a odpovídá u zdravých jedinců zhruba 120 mmHg (16 kPa). Při relaxaci srdečního svalu a plnění síní a komor odkysličenou krví jde o tzv. diastolu. Diastolický tlak je dolní hranicí pracovního zatížení cév a odpovídá zhruba 80 mmHg (10,7 kPa). V průběhu tlaku v aortě následuje nárůstu tlaku při systole tzv. diakrotický zářez – dolů orientovaný hrot na tlakové křivce, který odpovídá uzávěru aortálních chlopní, po něm již následuje diastola, viz Obrázek 4.

Tlak v cévním řečišti směrem od srdce klesá a přestává být závislý na srdeční akci. Tlak v menších cévách (kapiláry, venuly) je pak ustálený a mnohonásobně menší než v arteriích, viz Obrázek 5. Tomu odpovídá změna průměrů cév a tloušťky jejich stěn, jak uvádí Obrázek 6 [2]. Mění se i mohutnost jednotlivých základních vrstev cévních stěn, viz Obrázek 6. Skladba a struktura cévní stěny má přímý vliv na mechanické vlastnosti cév, tj. na charakteristiku mechanické odezvy při zatěžování.



Obrázek 4 – Průběh tlaku během srdečního cyklu v aortě a v srdeční komoře, vyznačen je též diakrotický zářez následující po systole [9], upraveno



Obrázek 5 – Průběh tlaku v závislosti na typu a velikosti cév [22]

5.1 Struktura cévní stěny

Cévní stěna je obecně složena ze tří základních vrstev: tunica intima, tunica media a tunica adventitia.

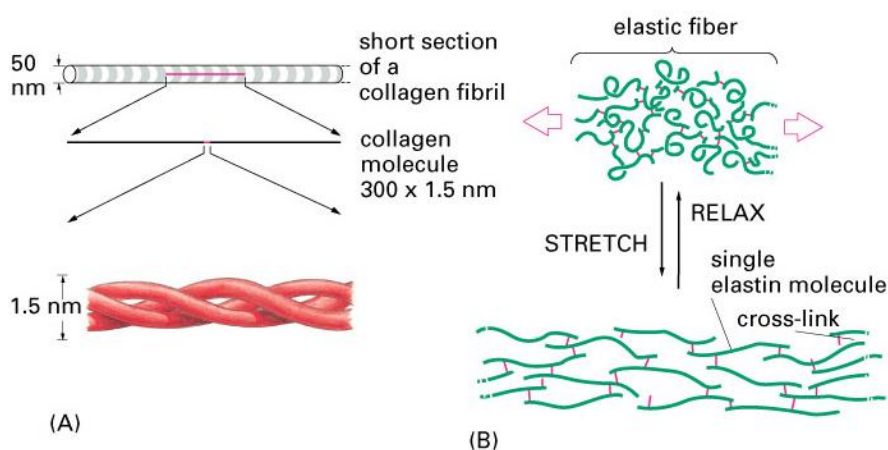
Tunica intima pokrývá vnitřní stranu cévní stěny a je tvořena jednou vrstvou endotelových buněk – tzv. endothelium. [10]. Endotelové buňky mají funkci výběrového transportu látek mezi cévním řečištěm a tkáněmi. Kapiláry jsou pak tvořeny pouze tunicou intimou s endotelovými buňkami [10]. Dochází v nich k tzv. kapilární výměně. Jde o proces, při kterém probíhá difúze kyslíku a živin z krve do tkání, a naopak i difúze krve z tkání do krevního řečiště. Endothelium je propojeno s okolní tkání cévní stěny tzv. bazální laminou.

Tunica media je prostřední vrstvou cévní stěny a je oddělena od tunicy interny elastinovou vrstvou lamina elastica interna, od tunicy adventitie je pak oddělena vrstvou lamina elastica externa. Tunica media je tvořena buňkami hladké svaloviny, kolagenními snopci a elastinovými membránami. Tloušťka a obsah jednotlivých složek medie má určující vliv na mechanické vlastnosti cév [2, 11].

Tunica adventitia je vnější vrstvou cévní stěny a je nejpevnější vrstvou. Její funkcí je přenos fyziologických změn do okolního těla a ochrana cévy před perforací při zatížení vyšším vnitřním tlakem. Sestává se z elastinových vláken a především z kolagenních vláken, které jsou uspořádány v trojitě šroubovicovité struktuře a sdružují se do svazků, viz Obrázek 7 [2]. Především dvě vrstvy jsou zásobeny živinami přímo z krve z cévního řečiště. Tunica adventitia je protkána malými cévkami, tzv. vasa vasorum, které tuto vrstvu zásobují krví především v cévách větších průměrů [12]. Schématické znázornění stavby cévní stěny tepen a žil je vidět na Obrázek 8.

Typ cévy	Aorta	Arterie	Arteriola	Kapilára	Venula	Véna	Véna cava
Průměr	20-25 mm	5-10 mm	10-50 μm	5-10 μm	10-20 μm	5-20 mm	25-30 mm
Průměrná tloušťka stěny	2 mm	1 mm	6 μm	0.5 μm	1 μm	0.5 mm	1.5 mm
Endothelium	■	■	■	■	■	■	■
Elastická tkáň	■	■	■			■	■
Hladká svalovina	■	■	■		■	■	■
Vazivová tkáň	■	■	■		■	■	■

Obrázek 6 – Přehled typů cév, jejich rozměrů a základního složení [13], upraveno



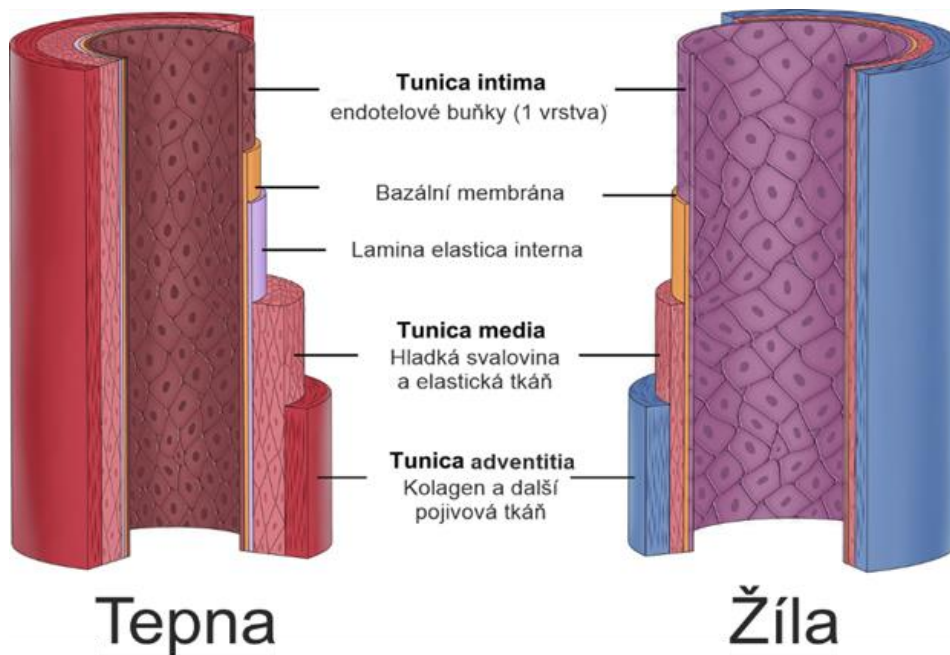
Obrázek 7 – Struktura molekul proteinu kolagenu (A) a elastinu (B), zde viditelné uspořádání kolagenních vláken do trojitě šroubovicovité struktury a mechanická odezva elastinových vláken (natažení a opětovné zvlnění) na úrovni elastinových molekul, které jsou mezi sebou spojeny kovalentními vazbami [14], upraveno

Tepny jsou rozděleny na dvě základní skupiny podle charakteristiky tunicy medie: elastické a svalové. Tepny s větším průměrem, jako například aorta, karotida, ilické tepny, vyznačující se bohatými elastickými lamelami, se řadí do elastických tepen, viz Obrázek 6. Velké množství elastických vláken ve stěně těchto tepen se při systole roztáhne a při diastole se vrací do původního stavu – tím vytváří pulsaci krve i během diastoly a přispívají tak k proudění krve řečištěm. Směrem k periferním částem cévního systému, kdy se zmenšuje průměr tepen, se tunica media stává méně elastickou a převládá hladká svalovina. Tyto tepny se pak označují jako svalové tepny. Na úrovni kapilár se průměr tepen pohybuje okolo 30-60 μm a tunica media obsahuje pouze 1–2 vrstvy hladké svaloviny. Tyto tepny se označují jako arterioly [10]. Tunica intima je u tepen tvořena

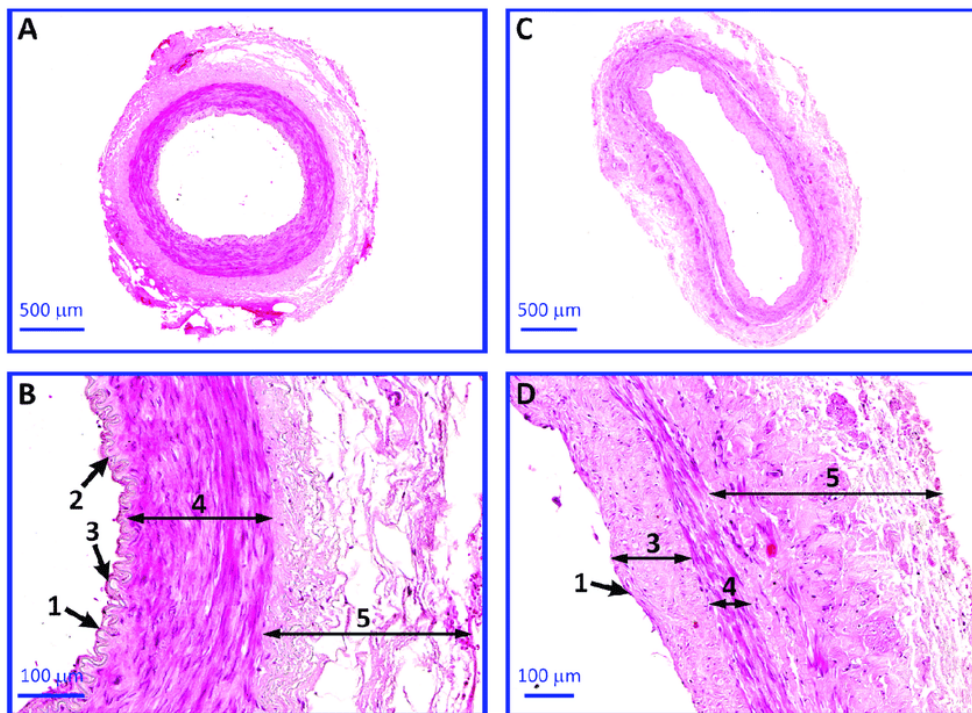
Zatěžování cév v lidském těle a struktura cévní stěny

jednou vrstvou endotelových buněk uložených na bazální membráně. Endotelové buňky jsou prodlouženy a uloženy ve směru proudění krve. Tunica intima je ve většině svalových tepen tenčí než u elastických tepen. Tunica media je tvořena koncentrickými elastinovými membránami, buňkami hladké svaloviny a kolagenními snopci. Elastinové membrány jsou proloženy početnými koncentrickými vrstvami vřetenovitých buněk hladké svaloviny, které jsou společně s kolagenními vlákny uspořádány do šroubovice o malém stoupání. Ve větších tepnách je počet vrstev buněk hladké svaloviny od 25 do 35, v menších tepnách pak pouze 3–6 vrstev [10, 15]. Vrstvy hladké svaloviny mohou svým stažením nebo relaxací zvětšit či zmenšit lumen tepny a aktivně tak ovlivnit průtok krve tepnou a tlak uvnitř tepny. O řízení stažení a relaxace hladké svaloviny v tepnách se starají nervová vlákna zvaná nervi vasorum, která prochází tepennou stěnou [16]. V lidské aortě je přibližně 40–60 elastinových membrán. Tunica adventitia elastických tepen je poměrně tenká, tvoří pouze 10 % tepenné stěny. Obsahuje kolagenní vlákna větších průměrů, které jsou uspořádány v podélném směru tepny do vlnitých svazků.[17] U svalových tepen je adventitia širší – často zabírá až polovinu složení cévní stěny. Adventitia obsahuje fibroblasty a je protkána nervovými vlákny [10].

Cévní stěna **žil** je stejně jako tepenná tvořena třemi základními vrstvami. Na rozdíl od tepen ale hranice mezi jednotlivými vrstvami není příliš patrná, viz Obrázek 9. Žíly mají v porovnání s tepnami tenčí stěnu, jsou obecně větších rozměrů a obsah vláken hladké svaloviny je menší. Pojivá tkáň je u žil více zastoupená než u tepen. Elastická vlákna jsou u žil orientována převážně v podélném směru v oblasti medie a adventitie. Střední a větší žíly obsahují cirkulárně i podélně uspořádané buňky hladké svaloviny, které jsou protkány kolagenními vlákny. U lidí převládá u žil v hrudní části podélně orientovaná hladká svalovina, například v žilách dolních končetin pak cirkulárně orientovaná hladká svalovina zabírá až 50 % cévní stěny [10]. Žíly jsou charakteristické chlopněmi, které jsou obsažené v endotelu cévní stěny. Tyto chlopně slouží jako prevence proti zpětnému toku krve, který může být zapříčiněn gravitací a hydrostatickým tlakem. Tunica adventitia zabírá u středních a větších žil zhruba 60 % až 75 % složení cévní stěny, viz Obrázek 6 [10].



Obrázek 8 – Schématické znázornění základní struktury tepen a žil [24]



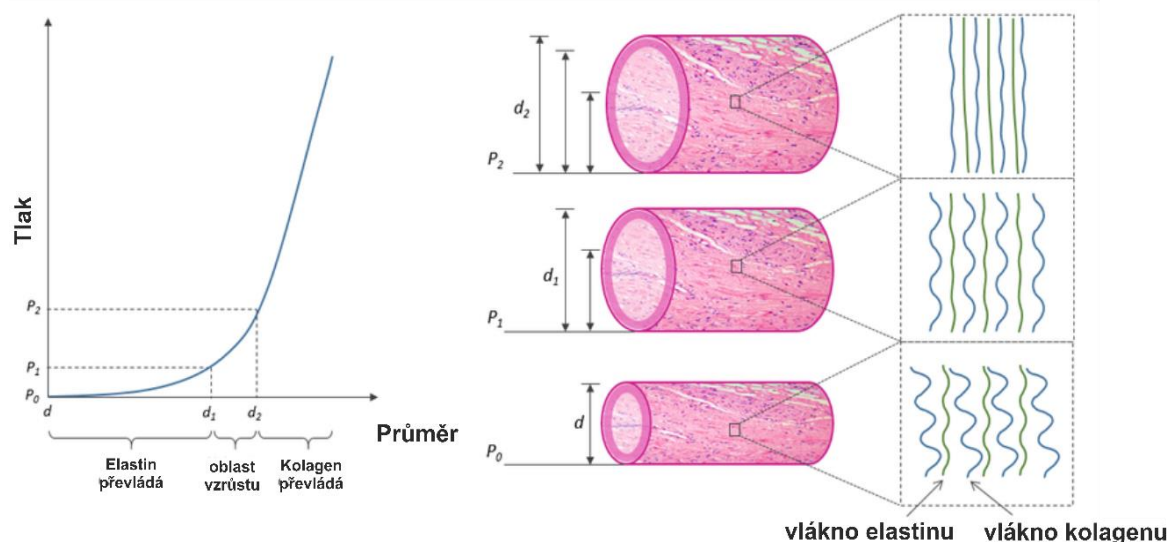
Obrázek 9 – Porovnání stavby cévní stěny tepny a žíly v histologickém řezu; a. thoracica interna (A, B); v. saphena (C, D); 1 – endothelium; 2 – elastica lamina interna; 3 – tunica intima; 4 – tunica media; 5 – tunica adventitia, [18]

5.2 Mechanické vlastnosti tepen

Stanovení obecných mechanických a strukturálních vlastností je velkým tématem ve výzkumu kardiovaskulárního systému. Ve struktuře tepenné stěny existuje mnoho proměnných, které mohou mít veliký vliv na mechanické vlastnosti cévní stěny. Struktura, mechanická odezva a vlastnosti se mohou měnit v závislosti na lokaci, věku, fyziologických podmínkách nebo na onemocnění [19].

Mechanické vlastnosti tepny jsou odvozeny především od tloušťky a složení vrstvy tunica media. Ta obsahuje složku elastinu a kolagenu, které se od sebe výrazně liší v hodnotách modulu pružnosti. Elastin dosahuje hodnot modulu pružnosti 0,6–1 MPa, zatímco kolagen až 1 GPa.

Počáteční fáze křivky závislosti napětí-deformace tak vychází pouze z mechanických vlastností elastinových vláken. Konečná fáze této křivky patří napěťové odezvě mechanických vlastností vláken kolagenu. Prostřední část křivky („oblast vzrůstu“) pak přísluší postupnému přenosu zátěže z elastinu na kolagen. Tato oblast odpovídá hodnotám normálního pracovního zatížení (80–120 mmHg) v tepnách. Nelineární odezva a vzrůstající modul pružnosti je způsoben zvlněním a náhodnou konfigurací vláken elastinu a kolagenu ve stavu bez zatížení. Při zatížení vnitřním tlakem se obě skupiny vláken natahují. Na úrovni diastolického tlaku jsou elastinová vlákna téměř plně natažená. Při dalším zatěžování až do hodnoty systolického tlaku dochází k napínání elastinových vláken a k postupnému narovnávání až napínání kolagenních vláken. Zvyšování tlaku nad pracovní zatížení se projeví plně nataženými elastinovými i kolagenními vlákny a mechanické vlastnosti napjatých kolagenních vláken jsou v této fázi určující

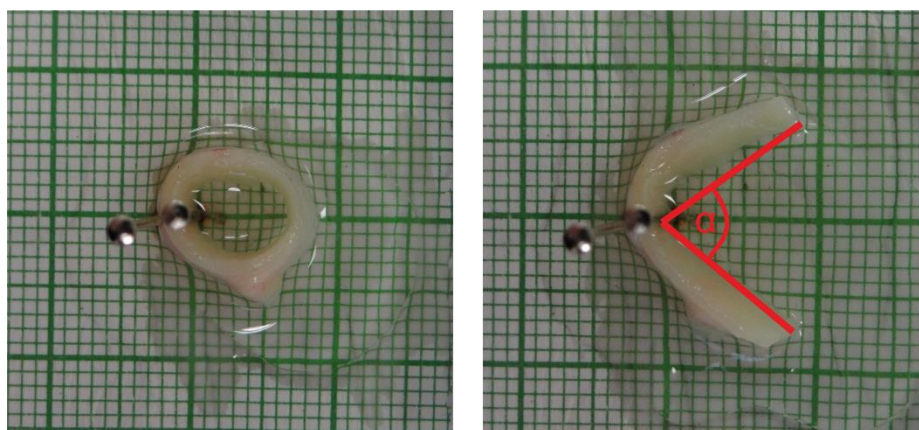


Obrázek 10 – Zatěžovací charakteristika tepenné stěny s vizualizací napínání vláken kolagenu a elastinu [17], upraveno

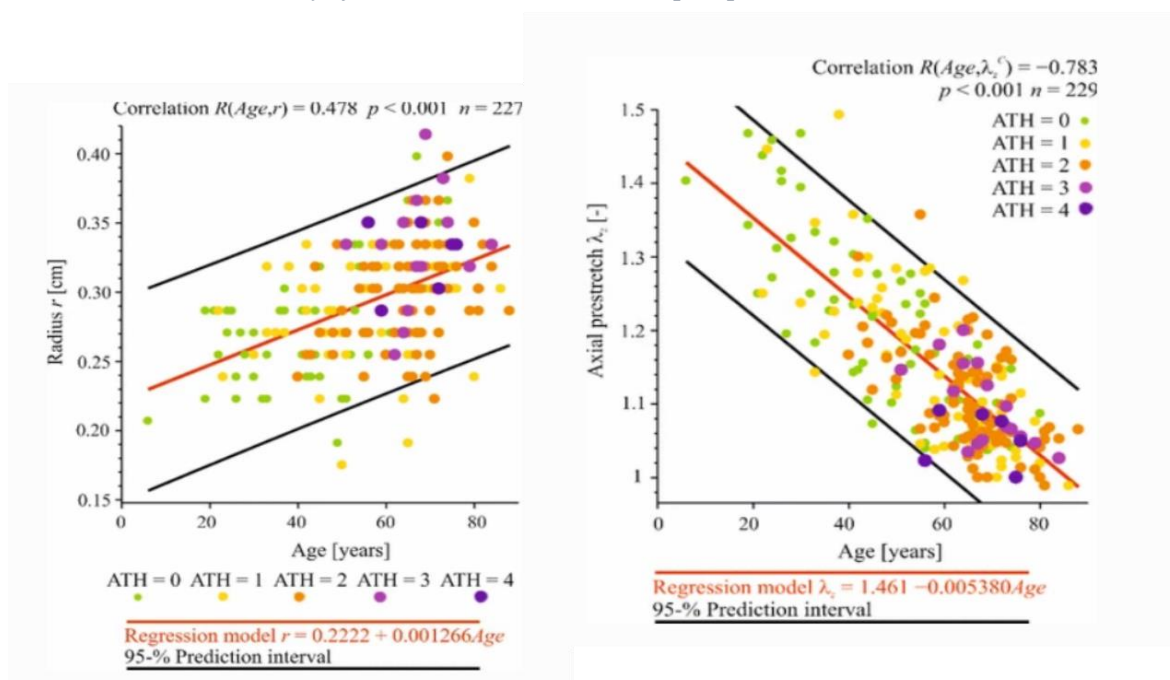
pro mechanickou odezvu tepny, viz Obrázek 10. Tato výrazná nelineární mechanická odezva je typická pro mechaniku cév a pro většinu měkkých biologických materiálů [17].

Kolagenní a elastinová vlákna jsou v tepenné stěně uspořádána do různých směrů. Tepenná stěna v různých směrech (obvodovém a axiálním) vykazuje různé mechanické vlastnosti. Hovoříme o důležité vlastnosti cévní stěny – anizotropii materiálu.

Tepny jsou v těle zatěžovány vnitřním předpětím v axiálním a obvodovém směru. Struktura tepenné stěny způsobí, že i po vyjmutí štěpu z těla setrvá tepna ve válcovitém tvaru. Tím se liší od žil, jejichž tvar po vyjmutí z těla kolabuje. Axiální předpětí tepen je patrné při vyoperování štěpu. Dojde ke smrštění tepny v podélném směru [20]. Obvodové předpětí se dá demonstrovat při rozstřížení kroužku tepny, kdy proběhne samovolné rozevření kroužku vlivem uvolnění předpětí v obvodovém směru, viz Obrázek 11.



Obrázek 11 – Samovolné rozevření kroužku tepenného štěpu do úhlu rozevření alfa jako demonstrace vnitřního předpětí v obvodovém směru



Obrázek 12 – Zvětšování vnitřního poloměru karotid v závislosti na věku (vlevo), snižování axiálního předpětí karotid v závislosti na věku [20]

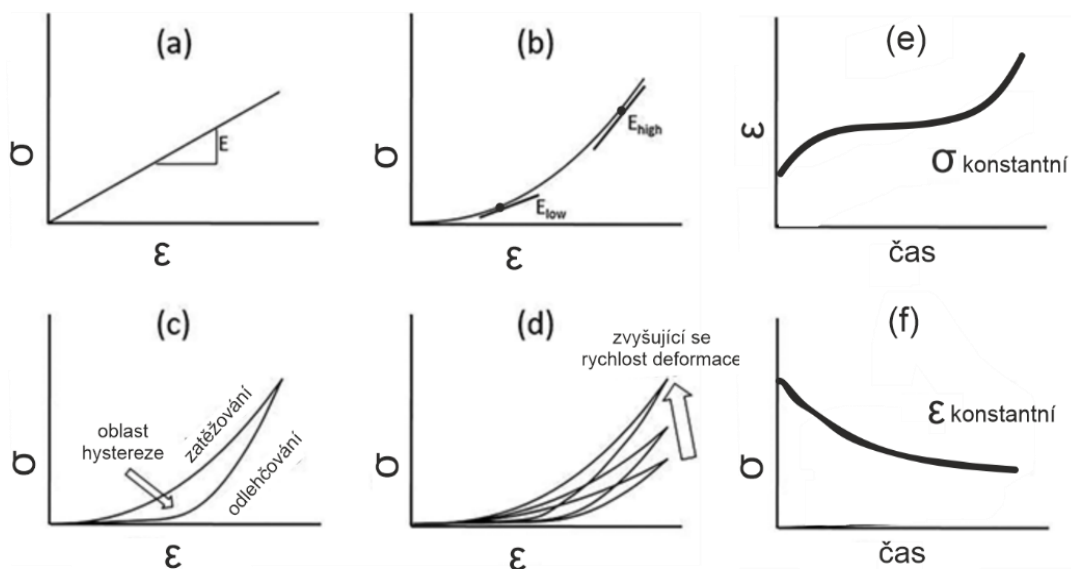
Zatěžování cév v lidském těle a struktura cévní stěny

Úhel rozevření kroužku je důležitým údajem pro zkoumání mechanických vlastností tepen. Vnitřní předpětí v axiálním směru klesá v závislosti na věku. V obvodovém směru dochází vlivem poklesu předpětí ve stěně k nárůstu hodnoty vnitřního poloměru tepny, viz Obrázek 12 [20].

Důležitá pro činnost cév je také interakce s orgány a svaly v těsné blízkosti.

Cévy jsou viskoelastický materiál – kombinují v sobě chování elastických a vazkých materiálů. Napětí takového materiálu je závislé nejen na deformaci (jak je tomu u elastických materiálů, viz Obrázek 13.a a Obrázek 13.b, ale i na rychlosti deformace (vazké materiály), viz Obrázek 13.d [2]. Při cyklickém zatěžování viskoelastického materiálu je patrná hystereze v tahovém diagramu, viz Obrázek 13.c. Křivka při zatěžování se liší od křivky při odlehčování. Oblast mezi těmito dvěma křivkami pak reprezentuje disipovanou energii v daném cyklu [1, 6]. Pro viskoelastické materiály je typický creep (tečení – zvyšování deformace při stálém napětí) a relaxace (snižování napětí za stálé deformace), viz Obrázek 13.e a Obrázek 13.f [2].

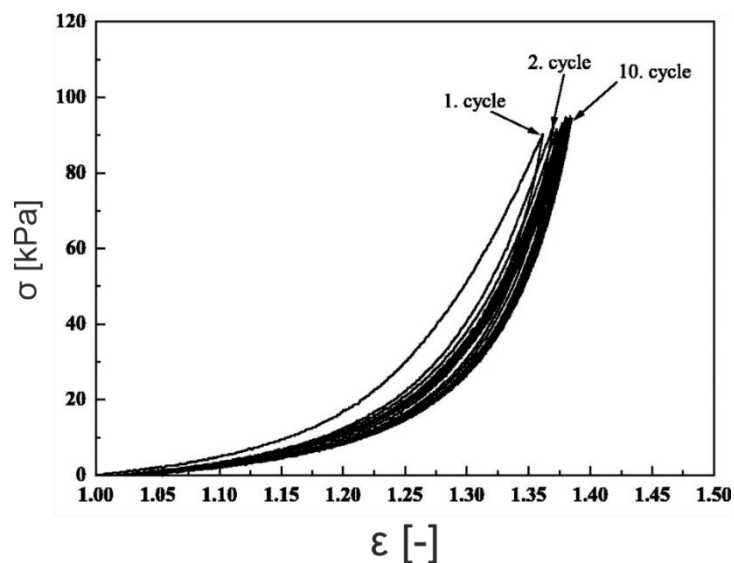
Pro získání stabilní mechanické odezvy cév při in vitro testování je nutné provést cyklickým zatěžováním předcyklování vzorku. Míra disipované energie se s dalšími cykly snižuje, až dojde k ustálení zatěžovací a odlehčující křivky. Viskoelastické cykly začnou být téměř shodné, viz Obrázek 15 [2].



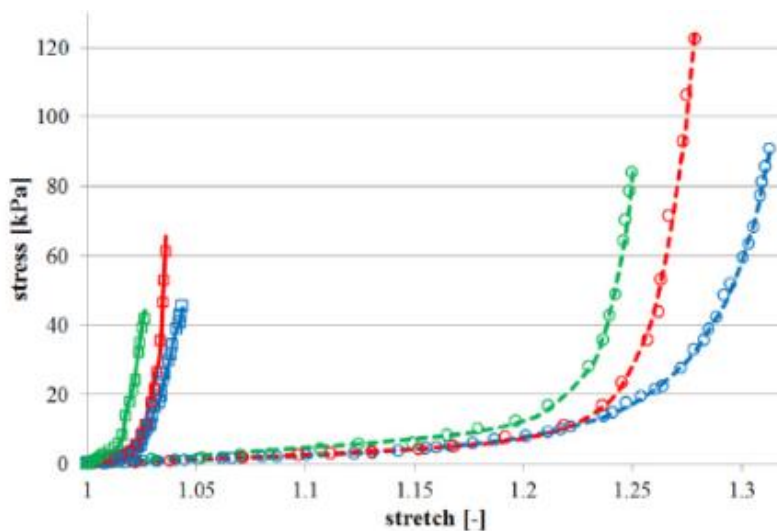
Obrázek 13 - Zatěžovací charakteristiky a) lineární elastický materiál s konstantním modulem pružnosti E ; b) nelineární elastický materiál a proměnným modulem pružnosti; c) viskoelastický materiál s viditelnou oblastí hystereze; d) zobrazení vlivu zvyšující se rychlosti deformace (tuhnutí); e) creep materiálu; f) relaxace materiálu [25], upraveno

Bylo zmíněno, že rozhodující vliv na velikost napětí ve viskoelastickém materiálu má rychlost deformace. V experimentální části této práce se pracuje s kvzistatickým zatěžováním – tedy zatěžováním s rychlostí deformace dostatečně malou, aby mohly být zanedbány setrvačné síly v materiálu. Vliv rychlosti zatěžování na mechanickou odezvu viskoelastického materiálu (zde VSM) ukazuje Obrázek 14. V tomto případě byly

porovnány tři rychlosti zatěžování při inflačně-extenzních testech a lze vyčíst, že žíly jako viskoelastický materiál vykazují vyšší tuhost při vyšších rychlostech zatěžování [2].



Obrázek 15 – Viditelné ustalování mechanické odezvy viskoelastického materiálu – v tomto případě *t. intima* věnčité tepny při cyklických uniaxiálních testech kvazistatickou rychlostí zatěžování [27], upraveno



Obrázek 14 – Zatěžovací charakteristiky VSM pro různé rychlosti zatěžování při inflačně-extenzních testech pro axiální (\square) a obvodový (\circ) směr; frekvence zatěžování: modrá – 0,04 Hz; červená – 0,5 Hz; zelená – 1 Hz [26]

6 Kryoprezervace cév

Kryoprezervace je proces, který slouží k uchování organel, buněk, tkání a dalších biologických struktur za pomoci velmi nízkých teplot [28]. Při kryoprezervaci jsou biologické struktury zmrazeny až na teplotu tekutého dusíku ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Při takto nízké teplotě jsou v biologickém materiálu výrazně zpomaleny nebo až zastaveny biologické a biochemické procesy. Hluboké zmrazení zpomaluje aktivitu molekul, které se podílejí na procesu biodegradace: enzymy štěpící proteiny, lipidy, DNA, RNA a v neposlední řadě molekuly vody. V současné době je metoda kryoprezervace užívána k uchování např. pohlavních buněk, embryí, krevních buněk nebo cévních štěpů, které mohou být použity jako cévní náhrady [28, 29].

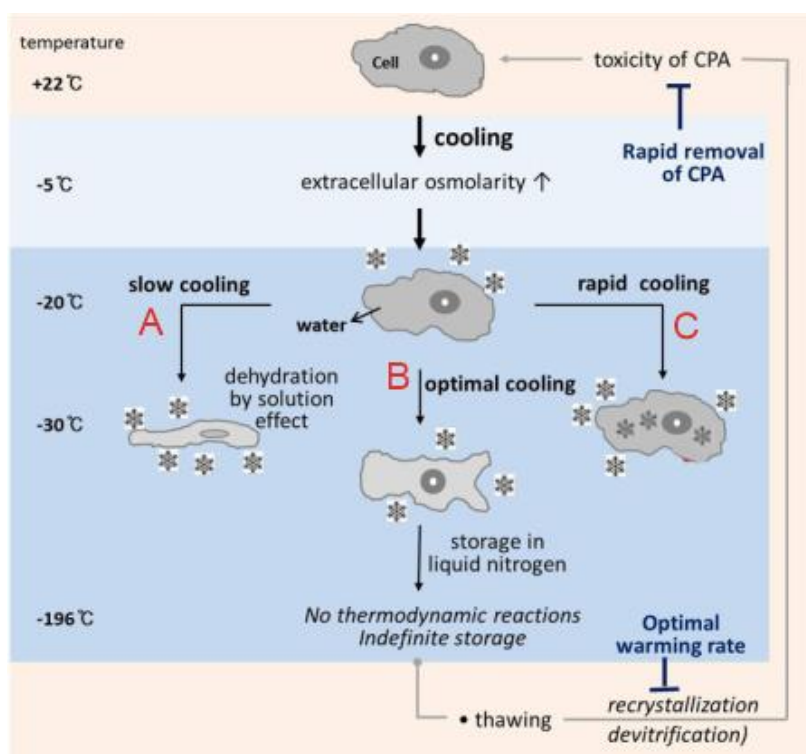
Pokud je u buněk zachována jejich struktura a funkčnost po zmrazení na takto nízké teploty, je nepravděpodobné, že by při následném skladování došlo k dalším buněčným změnám. Kryoprezervované struktury tak mohou být uchovány po teoreticky neomezenou dobu [30]. Hlavní komplikace při procesu kryoprezervace jsou spojené se vznikajícími krystalky ledu, které se mohou formovat přímo uvnitř buněk či v mezibuněčném prostoru. Vznikající led může buňky poškodit mechanicky nebo vlivem osmotické nerovnováhy. Formování ledu nastává při přechodových teplotách (-15 až $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$), kterým je biologický materiál vystaven hned dvakrát – při zmrazování a pozdějším rozmrazování. Rychlost zmrazování a rozmrazování má pak klíčový vliv na místo vzniku ledu a míru poškození buněk [31].

Při pomalém rozmrazování vzniká led mezi teplotou -5 až $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ nejprve v mezibuněčném prostoru. Uvnitř buněk je při této teplotě pouze přechlazená voda, pravděpodobně díky plazmatické membráně, která brání růstu krystalů ledu v cytoplazmě buňky. Přechlazená voda uvnitř buňky má vyšší chemický potenciál než mezibuněčný roztok s krystaly ledu. Vlivem osmotické nerovnováhy tak dochází k dehydrataci a destrukci buňky. Pokud je biologický materiál zmrazován příliš rychle, voda se nestačí osmotickým přenosem dostat ven z buňky a krystalky ledu vznikají přímo uvnitř buňky, kde způsobují mechanické poškození a až smrt buňky. Obecně, zmrazování pomalé či rychlé zapříčiňuje poškození až destrukci buněk, způsob poškození se ale liší [29, 31, 32].

Byly popsány dvě metody, které mohou sloužit jako prevence poškození buněk způsobené změnou skupenství vody: použití kryoprezervačních činidel a metoda vitrifikace. Při pomalém zmrazování je užito k redukci osmotické nerovnováhy a formování krystalů ledu kryoprezervačních činidel, tzv. kryoprotektantů (CPA – cryoprotective agents). Kryoprotektanty jsou většinou kapalné látky, nejčastěji glycerol nebo dimethylsulfoxid, které mají nízkou toxicitu a mohou pronikat přes plazmatickou membránu dovnitř buňky. Snižují tak osmotickou nerovnováhu a nedochází k destrukci buňky vlivem dehydratace. Rychlé zmrazování může mít za následek tvorbu krystalů a narušení struktury uvnitř buňky. Při teplotě okolo $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ však dochází k procesu



tzv. vitrifikace neboli skelnatění [33]. Jde o přechod ledu z krystalické fáze do homogenní, amorfní fáze. Pokud je použita vysoká rychlost zmrazování (řádově 10^6 °C/min), může být pozorován proces, kdy voda v biologické struktuře zaujme amorfní uspořádání okamžitě, bez přechodu přes krystalickou fázi. Led v amorfním stavu, po vitrifikaci, pak může buňku poškodit pouze minimálně. Proces zmrazování takto vysokými rychlostmi je však technologicky náročný. Vitrifikaci bez krystalické fáze lze provést i při nižších rychlostech zmrazování, je však potřeba použít koncentrovanějších kryoprotektantů, které už mohou mít zvýšenou toxicitu [31, 32].



Obrázek 16 – Schématický proces kryoprezervace buňky – vliv rychlosti zrazování a poškození buňky; A – pomalé zmrazování a dehydratace buňky vlivem osmotické nerovnováhy; B – optimální rychlost zmrazování; C – rychlé zmrazování a tvorba krystalů ledu přímo v cytoplasmě buňky; CPA – kryoprotektanty (cryoprotective agents) [28], upraveno

Rychlost a způsob rozmrazení vzorků má také velký vliv na úspěšnost kryoprezervace. Maximální mechanické napětí v procesu kryoprezervace se objevuje právě v průběhu rozmrazování vlivem změn teplot [31]. Rychlý způsob rozmrazení tkání může mít za následek nárůst napětí a vznik prasklinek. Dle výzkumu [33] provedeném na rychle rozmrazených králičích karotidách se objevily trhlinky v obvodovém směru arterií při přechodu přes oblast teploty od -150 do -100 °C. Jako prevence vzniku vnitřních pnutí při rychlém rozmrazování může sloužit pomalejší ohřev z teploty skladování do teploty devitrifikace – zhruba do -100 °C. Poté již může být uplatněn rychlý způsob rozmrazení s menším rizikem vzniku poškození buněk tepenné stěny [33].

Hustota uspořádání buněk v biologické struktuře hraje také důležitou roli při uvažování poškození během kryoprezervace. Led v mezibuněčném prostoru je

Kryoprezervace cév

prakticky neškodný u kryoprezervace samostatných buněk. U kryoprezervace celých tkání s buňkami uspořádanými v těsné blízkosti však může jejich strukturu vážně narušit. Proto jsou tkáně s větší hustotou buněk ve struktuře, např. cévní stěna tepen, která obsahuje velké množství svalových buněk, více ohroženy poškozením krystalky ledu než žíly, kde hustota svalových buněk není tak vysoká [32].

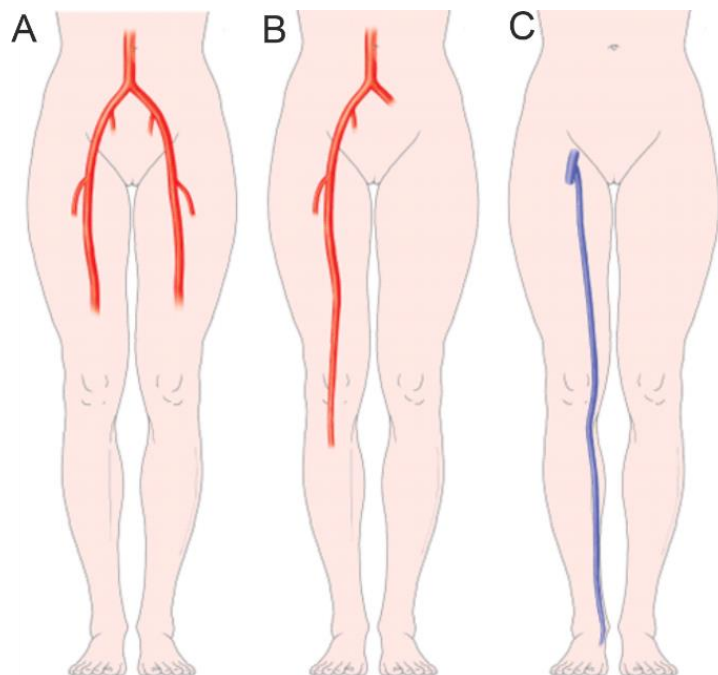
Optimální rychlost pro minimální poškození při zmrazování se liší pro různé buňky. Z výzkumu [18] provedeného na prasečí aortě vychází optimální rychlost zmrazování 0,3 °C/min pro buňky hladké svaloviny a 10 °C/min pro buňky endothelia. Jako jednotná optimální rychlost zmrazování pro kryoprezervaci cév se uvádí 1 °C/min do teploty zhruba -70 °C, kdy je možné cévu rovnou přemístit do místa skladování o teplotě -196 °C [32].

6.1 Kryoprezervace cév v ČR

Metoda kryoprezervace pro uchování cévních štěpů se v České republice používá od roku 2011. Mezi roky 2011 a 2016 bylo v ČR v klinické praxi úspěšně aplikováno celkem 87 kryoprezervovaných cévních štěpů různých krevních skupin. Z toho bylo 59 saphenních žilních štěpů, 12 tepenných štěpů bifurkace aorty a 16 jednostranných ilicko-femoro-popliteálních tepenných štěpů [34]. Existuje zde síť licencovaných chirurgických klinik, které úzce spolupracují s Tkáňovou ústřednou Fakultní nemocnice v Hradci Králové (TÚ FNHK). Cévy vyoperované během multiorgánových odběrů jsou během krátké doby studené ischemie – do 12 hodin od vyoperování – převezeny při teplotě tajícího ledu v nádobách s ochrannými roztoky do TÚ FNHK, kde dochází ke kryoprezervaci. K vzorkům je přiložena dokumentace s údaji o vzorcích a dárci pro provedení testů v diagnostických laboratořích. V ČR jsou ke kryoprezervaci nejčastěji odebrány tři typy cév: bifurkace aorty s ilickými a femorálními tepnami, tepny dolní končetiny od bifurkace aorty až po popliteální tepny a VSM v plné délce, viz Obrázek 17. Preferovanou krevní skupinou dárců je skupina 0. Dále mohou být v TÚ uchovány i některé méně obvyklé vzorky: bifurkace karotidy, oblouk aorty s tepnami hlavy, vena cava nebo bifurkace ilických tepen [34].

Po vstupní kontrole a dekontaminaci v TÚ jsou cévní štěpy vloženy do plastových pytlů, které obsahují 50 ml předchlazeného 6% roztoku Voluven a stejné množství předchlazeného 20% roztoku dimethylsulfoxidu, který slouží jako kryoprotektant. Plastové pytle jsou tepelně uzavřeny a vloženy do mrazicího boxu, ve kterém je snižována teplota rychlostí 1 °C/min do dosažení teploty 90 °C a následně rychlostí 5 °C/min až na teplotu -150 °C. Cévní štěpy jsou skladovány v plynné fázi tekutého dusíku. Při potřebě implantování konkrétního štěpu jsou plastové pytle se štěpy vyjmuty z mrazicího boxu a dopraveny na operační sál, kde jsou rozmrazeny standardním protokolem – v chladničce s postupně vzrůstající teplotou od 2 do 8 °C po dobu 2 hodin. Pokud je po této době ve štěpech stále přítomný led, rozmrazení může být dokončeno při pokojové teplotě. Ihned

po kompletním roztání jsou štěpy vyjmuty z původních plastových pytlů a vloženy do předchlazeného konzervačního roztoku, dokud nejsou implantovány [34].



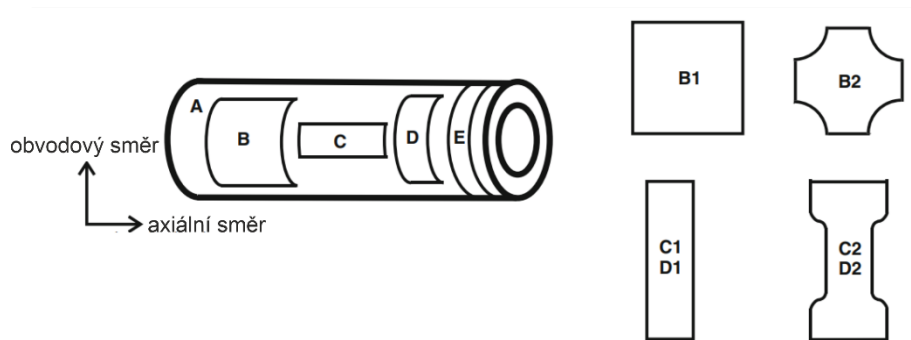
Obrázek 17 – Nejčastěji kryoprezervované cévy a jejich části v ČR;
A – bifurkace aorty s ilickými a femorálními tepnami;
B – tepny dolní končetiny od bifurkace aorty až po popliteální tepny;
C – VSM v plné délce [34]

7 Mechanické testování cév

V této části práce jsou popsány některé používané metody in vitro testování cévních štěpů. Při testování biologických tkání existuje spousta dodatečných úvah a in vivo podmínek, které je potřeba brát v úvahu při vyhodnocování testování. Testování in vitro nezahrnuje vlivy, které by byly přítomné při in vivo testování. Jde především o interakce cév se sousedními orgány, svalovou tkání nebo s odezvou nervové soustavy. In vitro testování poskytuje možnost opakování zatěžování při stálých podmínkách a možnost přesného pozorování měření mechanické odezvy. In vitro testy je pak zkoumána pouze pasivní mechanická odezva cév, jelikož nedochází např. k aktivitě svalových buněk v tepenné stěně, jak by tomu bylo při in vivo pozorování [2, 35].

Při jakémkoli typu in vitro testování dochází při prvních cyklech zatěžování k ustalování mechanické odezvy materiálu. Hystereze se s každým dalším cyklem zmenšuje, až dojde k ustálení zatěžovací křivky, viz Obrázek 15. Z toho důvodu je pro získání ustálené mechanické odezvy nutné provést předcyklování. Ke stabilizaci charakteristiky je za dostatečné považováno provedení okolo 10 cyklů [35].

Kvůli výrazné anizotropii cévní stěny se vyhodnocení provádí ve dvou směrech – v obvodovém a axiálním (podélném) vzhladem k pomyslné podélné ose cévy, viz Obrázek 18. Při vyhodnocení testů se téměř vždy uvažuje předpoklad nestlačitelnosti tloušťky cévní stěny, tedy že cévní stěna při deformování nemění svůj objem [2].

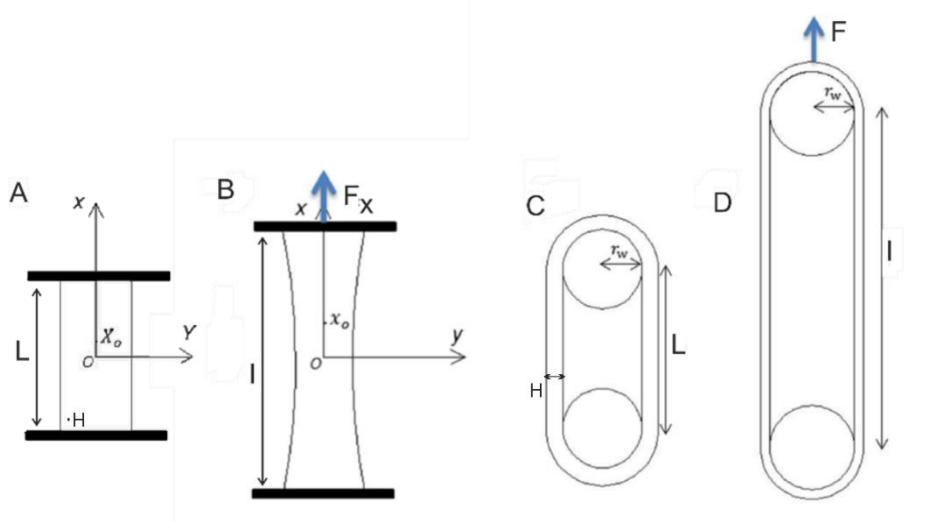


Obrázek 18 – Znárodnění vytnutí vzorků pro testování; A – část tepenného štěpu určená pro inflačně-extenzní testy; B – čtvercový vzorek pro dvouosou tahovou zkoušku; C a D – obdélníkový vzorek pro jednoosou tahovou zkoušku v axiálním (C) a obvodovém směru (D); E – vytnutý kroužek pro jednoosou tahovou zkoušku v obvodovém směru; B1 a B2 je čtvercový a křížový tvar vzorku pro dvouosou tahovou zkoušku; C1 a D1 je obdélníkový tvar a C2 a D2 je tzv. dumb-bell tvar vzorku pro jednoosou tahovou zkoušku [36], upraveno

Jednoosá tahová zkouška je nejjednodušší a nejběžněji používanou metodou testování mechanických vlastností cév. Při zkoušce je tahem namáhán obdélníkový výřez cévní stěny v ose jednoho směru. Často je tahem vzorek namáhán až do destrukce a měřena je počáteční délka, změna délky ve zkoumaném úseku a síla, která je vyvinuta na vytvoření této deformace v daném směru. Délka zkoumaného úseku může být měřena

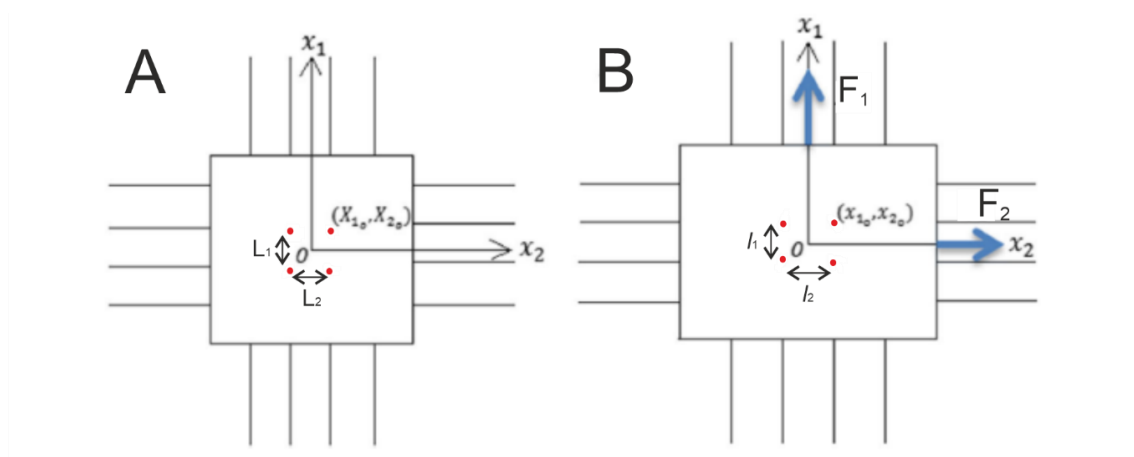
mezi upínacími čelistmi aparatury nebo mezi značkami v centrální oblasti vzorku, kde již není oblast deformace ovlivněné upnutím vzorku. Vzhledem k anizotropii cévní stěny je potřeba rozlišit, zda je vzorek upnut a testován v obvodovém nebo axiálním směru. Rozměr vytnutého vzorku ve směru, ve kterém je testován jednoosou zkouškou, by měl být zhruba desetinásobkem druhého rozměru. Dále je změřena tloušťka vzorku. Vzorek je předcyklován, dokud není zaznamenána ustálená charakteristika, a poté je plně zatížen až do destrukce. Především u cév menšího průměru je možné využít jednoosou tahovou zkoušku prstence cévy. Ze vzorku cévy je vytnut prstenec, viz Obrázek 18, do kterého je vložena dvojice kolíků či drátů, které jsou poté postupně vzdalovány od sebe. Tím je v prstenci vytvořeno jednoosé napětí v obvodovém směru. Zaznamenávána je vzdálenost kolíků od sebe a uplatněná síla při roztahování prstence. Oba způsoby jednoosé tahové zkoušky jsou na Obrázek 19 [2, 35].

Výsledky jednoosé zkoušky nejsou vzhledem k zatěžování pouze v jednom směru příliš komplexní. Mohou však být uplatněny při komparativních zkoumáních jednotlivých vzorků například z rozdílných částí těla nebo zkoumání vlivu onemocnění na cévní stěnu [35].



Obrázek 19 – Schematické znázornění jednoosé tahové zkoušky;
 A a B – standardní jednoosá tahová zkouška obdélníkového vzorku cévní stěny v referenční poloze a poloze při zatížení;
 C a D – jednoosá tahová zkouška prstence cévy v referenční poloze a poloze při zatížení; r_w – poloměr drátku přenášejícího zatížení [35], upraveno

Dvouosá tahová zkouška pokročilejší metodou testování pro určení mechanické odezvy materiálu cévní stěny. Při této zkoušce je většinou na čtvercový výstřižek cévní stěny aplikována tahová síla ve dvou vzájemně kolmých směrech, viz Obrázek 20. Namáhání ve dvou směrech zároveň tak simuluje in vivo zatěžování cévní stěny lépe než prosté jednoosé testování. Testování ve dvou směrech zároveň je vhodné s přihlédnutím k anizotropii cévní stěny. Na jednotlivých stranách čtvercového výstřižku jsou na vzorek umístěny svorky nebo háčky, přes které je přenášena na vzorek tahová síla ve dvou směrech. Zatěžování v jednotlivých směrech může být aplikováno nezávisle na sobě. Může



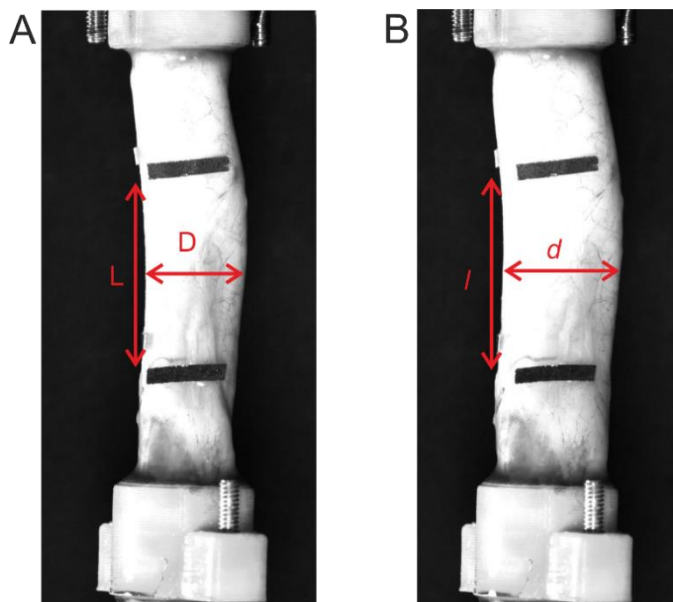
Obrázek 20 – Schematické znázornění dvouosé rovinné tahové zkoušky, viditelně na sebe kolmé směry namáhání čtvercového vzorku, v centrální oblasti červeně vyznačené značky pro vyhodnocení posunů digitální korelací obrazu; A – bez zatížení; B – se zatížením [35], upraveno

tak být například simulováno proměnné zatěžování v obvodovém směru při konstantním axiálním předpětí nebo může být zkoumán určitý poměr zatížení ve dvou směrech. Vyhodnocena je aplikovaná síla a deformace vzorku v jednotlivých směrech. Deformace vzorku je analyzována sledováním dislokace markerů v centrální oblasti čtvercového vzorku. V centrální oblasti jsou totiž zanedbatelné vlivy deformací z okrajů vzorku, které jsou způsobené upnutím vzorku do testovací aparatury. Dislokace markerů jsou měřeny pomocí laserové interferometrie či digitální korelace obrazu [2, 35].

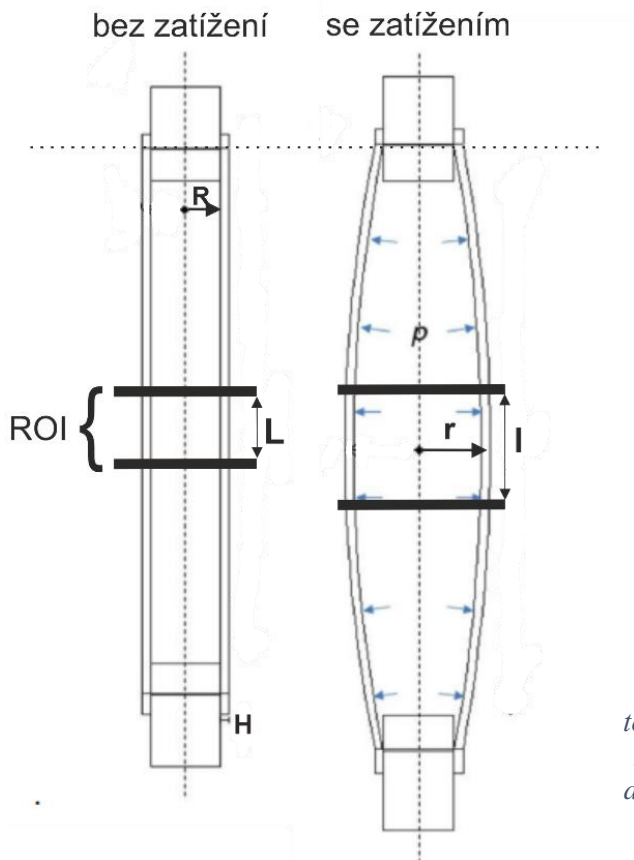
Inflačně-extenzní test je metodou, která nejlépe simuluje zatěžování cévní stěny pulsací krve. Testování touto metodou a konkrétní testovací aparaturou bylo využito i v této práci. Při tomto testu je cévní štěp uchycen mezi dva upínací trny. Do uzavřeného okruhu je pulsátorem cyklicky pumpovaná kapalina, která způsobí namáhání cévní stěny vzorku vnitřním tlakem. Cyklické namáhání vnitřním tlakem tak simuluje pulsaci krve. Vnitřní tlak na cévní stěnu vzorku způsobí deformaci v obvodovém směru a díky možnému posuvnému upínacímu trnu současně i deformaci v axiálním směru, viz Obrázek 21 a Obrázek 22.

Analýzou rozdílného deformování cévní stěny v těchto dvou směrech lze sledovat vliv a míru anizotropie. Záznam průběhu vnitřního tlaku je snímán pomocí tlakového senzoru. Průběh změny rozměrů vzorku je většinou získáván bezkontaktním způsobem – snímáním vzorku při testování kamerovým systémem – a vyhodnocení změn rozměrů pomocí detekce hran z obrazu či digitální korelací obrazu [35]. Pro obrazovou analýzu mohou být jako reference užity nalepené značky a obrysy vzorku, které s narůstajícím vnitřním tlakem mění svou pozici, viz Obrázek 21 a Obrázek 22. Změny rozměrů jsou vyhodnoceny v tzv. oblasti zájmu (ROI – region of interest), viz Obrázek 22, která je v centrální oblasti vzorku, kde jsou deformace jen zanedbatelně ovlivněny upnutím vzorku do upínacích trnů.

Řízením frekvence pulsace kapaliny je možné při testech simulovat různé rychlosti zatěžování. Dále je možné aplikovat vnější silový účinek v axiálním směru pro vytvoření axiálního předpětí vzorku nebo například aplikovat krut pro vytvoření smykových napětí v cévním štěpu během testování [35]. Konkrétní metoda tohoto testu, použitá v rámci této práce, je popsána v kapitole 9.2.



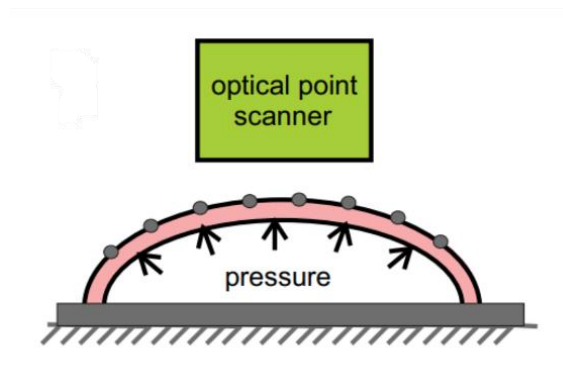
Obrázek 21 – Snímání průběhu deformování tepenného štěpu při inflačně-extenzním testu; A – bez zatížení; B – se zatížením



Obrázek 22 – Princip inflačně-extenzních testů, znázornění změn základních rozměrů při zatížení štěpu vnitřním tlakem, nahoře pevný a dole pohyblivý upínací trn, vyznačena oblast ROI [35], upraveno

Mechanické testování cév

Další metodou inflačního testu může být také tzv. bublinový test. Při inflačním bublinovém testu je planární vzorek cévní stěny hermeticky upnut a je zespona namáhán vnitřním tlakem, který je vytvořen pumpováním kapaliny [36]. Výsledkem je vypouklý vzorek cévní stěny ve tvaru vrchlíku, viz Obrázek 23. Je zaznamenáván vnitřní tlak a deformace jsou získány z digitální korelace obrazu.



Obrázek 23 – Schéma bublinového inflačního testu, šedé body znázorňují značky pro vyhodnocení deformací digitální korelací obrazu [36]

Nestlačitelnost cévní stěny při inflačně extenzních testech, kdy je cévní štěp považován za dokonale válcovou nádobu, ve které jsou deformace uvažovány pouze v normálovém směru a jsou zanedbány smykové složky napětí, lze vyjádřit vztahem

$$\lambda_c \cdot \lambda_a \cdot \lambda_r = 1, \quad (1)$$

kde

$$\lambda_c = \frac{r}{R}, \quad \lambda_a = \frac{l}{L}, \quad \lambda_r = \frac{h}{H} \quad (2)$$

jsou streče v jednotlivých směrech.

Při stanovení důležitých předpokladů, že tloušťka cévní stěny vzorku je nestlačitelná, tepenný štěp je dokonale válcová nádoba s kruhovým průřezem a smykové složky napětí jsou zanedbatelně malé, se pak dá deformace při inflačně-extenzním testu v obvodovém směru vzorku vypočítat dle vztahu

$$\varepsilon_c = \frac{r - R}{R}, \quad (3)$$

kde r je okamžitý poloměr vzorku, R je referenční poloměr vzorku, viz Obrázek 22 – obě hodnoty jsou získané z analýzy obrazu z kamer pomocí detekce hran z obrazu. Pro výpočet deformace v axiálním směru, za předpokladu platnosti výše uvedených předpokladů, platí:



$$\varepsilon_a = \frac{l - L}{L}, \quad (4)$$

kde l je okamžitá délka vzorku v ROI, L je referenční délka vzorku v ROI, viz Obrázek 22.

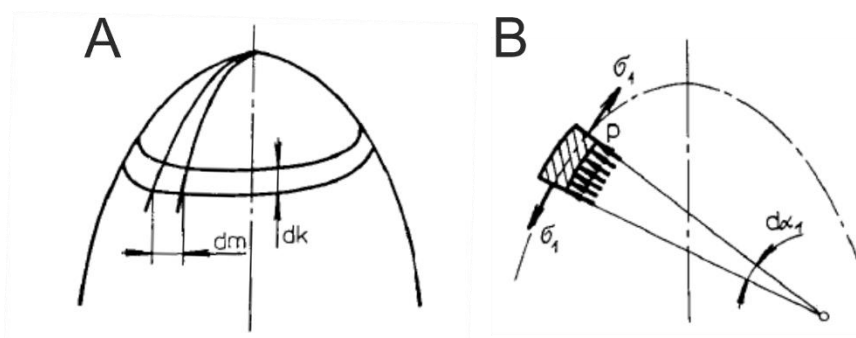
Po výpočtu deformací je možné vynést zatěžovací charakteristiky vzorků v závislosti tlak-deformace.

Pro výpočet napětí vyvolaného vnitřním tlakem lze pro cévní štěpy při splnění jistých předpokladů (viz kapitola 8) využít teorii tenkostěnných nebo tlustostěnných válcových rotačně symetrických nádob. V této práci byla použita teorie tenkostěnných válcových rotačně symetrických nádob. Jedná se o jednodušší metodu výpočtu, při které může a nemusí vzniknout větší chyba při určení napětí v cévní stěně oproti teorii tlustostěnných nádob. Při porovnávání skupin vzorků, o kterém je i tato práce, je ale tato metoda dostatečně relevantní [2].

K popisu a predikci mechanické odezvy cévní stěny může sloužit také matematické modelování – konstitutivní rovnice, které mají za cíl co nejpřesněji popsat skutečnost, a současně přijímají řadu idealizovaných předpokladů. Odezva cévní stěny je modelována dle hyperelastických nebo viskoelastických modelů pro anizotropní materiály. Tyto modely pracují s matematickými předpisy hustoty deformační energie. Dle hyperelastických modelů je deformační energie závislá na míře deformace a materiálových parametrech, které jsou získány na základě experimentů a dopočítány. Jednotlivé modely se liší výpočtovými vztahy pro hustotu deformační energie, počtem a typem materiálových parametrů. Mezi nejužívanější hyperelastické modely pro cévní stěnu patří např. HGO model (dle autorů - Holzapfel, Gasser, Ogden), model GOH (stejní autoři), který doplňuje HGO o uvažování nejednoznačnosti orientace kolagenních snopců, nebo model Fungův či Baekův.

8 Teorie tenkostěnných nádob – skořepin

Tato teorie popisuje namáhání v konstrukčních elementech plošného charakteru, jejichž jeden rozměr – tloušťka – je výrazně menší než ostatní rozměry. Pokud jde o válcové skořepiny jde o poměr mezi průměrem válce a jeho tloušťkou a ten to poměr by měl být 10:1 a vyšší, aby byla splněna podmínka pro uvažování skořepiny. Dále je potřeba pro výpočty napětí ve skořepinách potřeba uvažovat tzv. membránový stav skořepiny.



Obrázek 24 – Vytnutí nekonečně malého elementu mezi dvě meridiány a dvěma rovnoběžkami (A) a znázornění na sebe kolmých napětí způsobených vnitřním tlakem ve směru meridiánů a rovnoběžek (B) [38]

Podmínky pro skořepinu, která se nachází v membránovém stavu jsou: velikost spojitého zatížení stěny skořepiny se nesmí měnit náhle, tloušťka stěny skořepiny se nesmí měnit náhle, vnější síly působící na skořepinu (včetně reakcí v uložení) musí mít směr tečny k povrchu skořepiny, poloměry křivosti a poloha středu křivosti se nesmí měnit náhle. Všechny tyto předpoklady by v teoretické rovině měly být během inflačně-extenzních testů cévních štěpů splněny [38].

Pro stanovení napjatosti v rotačně symetrické membráně je potřeba v tělesa vyjmout nekonečně malý element mezi nekonečně blízkými rovnoběžkami a dvěma nekonečně blízkými meridiány, viz Obrázek 24.A. Na vytnutý element působí tlakové zatížení p a element je udržován v rovnováze napětím σ_1 ve směru meridiánu a zároveň napětím σ_2 ve směru rovnoběžky, viz Obrázek 24.B. Pro sestavení rovnice rovnováhy je potřeba schematicky nakreslit vyňatý element se všemi silovými účinky, které na něj působí, viz Obrázek 25. Složková rovnice rovnováhy do směru normály n vstupuje do ní síla dF a síly vyvolané ve stěnách elementu napětími σ_1 a σ_2 . Tyto síly jsou v rovnici vyjádřeny svými svislými (sinusovými) složkami [38]. Rovnice rovnováhy má tvar

$$2 \cdot \sigma_1 \cdot \sin \frac{d\alpha_1}{2} \cdot H \cdot dm + 2 \cdot \sigma_2 \cdot \sin \frac{d\alpha_2}{2} \cdot H \cdot dk - dF = 0 \quad (5)$$

Pro malé úhly platí



$$\sin \frac{d\alpha_1}{2} \approx \frac{d\alpha_1}{2} \quad \text{a} \quad \sin \frac{d\alpha_2}{2} \approx \frac{d\alpha_2}{2} \quad (6)$$

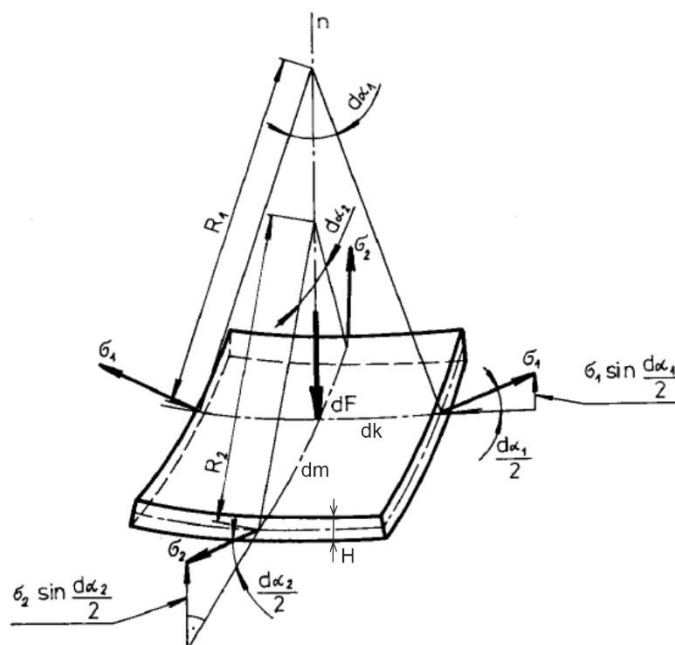
a dále platí

$$\begin{aligned} dm &= R_2 \cdot d\alpha_2 \quad \text{a} \quad dk = R_1 \cdot d\alpha_1 \\ dF &= p \cdot dm \cdot dk = p \cdot R_2 \cdot d\alpha_2 \cdot R_1 \cdot d\alpha_1. \end{aligned} \quad (7)$$

Po dosazení vztahů (6) a (7) do rovnice (5) a po úpravách vzniká rovnice rovnováhy ve směru normály v jednoduchém tvaru

$$\frac{\sigma_1}{R_1} + \frac{\sigma_2}{R_2} = \frac{p}{H}. \quad (8)$$

Tento tvar rovnice rovnováhy se nazývá Laplaceova rovnice.



Obrázek 25 – Vyňatý element skořepiny s vyznačenými silovými účinky [38], upraveno

Vzhledem k uvažování cévních štěpů jako válcových skořepin s kruhovým průřezem, je potřeba modifikovat obecný tvar Laplaceovy rovnice. Napětí ve dvou směrech můžeme rozlišit na napětí v obvodovém směru σ_c a na napětí v axiálním směru σ_a . Poloměr křivosti v obvodovém směru je určen poloměrem válcové skořepiny r a poloměr křivosti v axiálním směru je vzhledem ke geometrii otevřeného válce roven nekonečnu, viz Obrázek 26. Laplaceova rovnice tak má pro válcové skořepiny kruhového průřezu tvar

$$\frac{\sigma_c}{r} + \frac{\sigma_a}{\infty} = \frac{p}{h}. \quad (9)$$

Z toho napětí v obvodovém směru je potom

$$\sigma_c = r \frac{p}{h}. \quad (10)$$

Napětí v axiálním směru lze odvodit dle Obrázek 26, kde je vyznačena síla Q způsobená vnitřním tlakem p .

Napětí v axiálním směru lze pak vyjádřit jako

$$\sigma_a = \frac{Q}{S} = \frac{p\pi r^2}{2\pi r h} = r \frac{p}{2h} = \frac{\sigma_c}{2}. \quad (11)$$

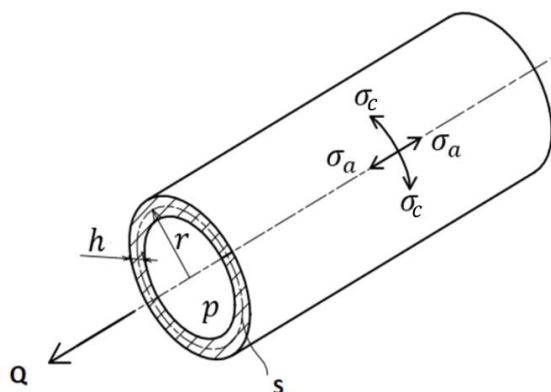
Pro vyjádření okamžité tloušťky stěny h je možné využít vztah (1) a (2) uvažující nestlačitelnost cévní stěny

$$\lambda_r = \frac{h}{H} = \frac{1}{\lambda_c \cdot \lambda_a} \rightarrow h = \frac{H \cdot R \cdot L}{l \cdot r}. \quad (12)$$

Po dosazení vztahu (12) do vztahu (10) je vyjádřen výsledný vzorec pro výpočet napětí v obvodovém pro válcovou skořepinu s kruhovým průřezem:

$$\sigma_c = p \frac{r^2 l}{RHL}. \quad (13)$$

Vztah pro výpočet napětí v axiálním směru pro válcovou skořepinu s kruhovým průřezem zůstává stejný jako ve vztahu (11).



Obrázek 26 – Znázornění namáhání a silových účinků na cévní stěnu při inflačně-extenzních testech, ze kterého vychází výpočty napětí v jednotlivých směrech



9 Experimentální část

Experimentální část této práce se týkala především zpracování dat získaných z inflačně-extenzních testů. Tento typ in vitro mechanických testů se snaží přiblížit namáhání cévní stěny v lidském těle. Byla k dispozici data z celkem 62 inflačně-extenzních testů, tepenné štěpy byly získány od 32 dárců. Při testování byl vždy snímán průběh vnitřního tlaku tlakovým senzorem a deformace vzorků byly zaznamenávány dvěma kamerami. K získání hodnot deformací bylo v rámci této práce nutné zpracovat metodou analýzy obrazu (detekcí hran) cca 372 000 snímků.

9.1 Vzorky

V rámci této práce byly zkoumány a porovnávány čtyři skupiny vzorků tepenných štěpů:

- **nativní štěpy získané z multiorgánových odběrů**, které byly testovány do 24 hodin od úmrtí pacienta – celkem 5 vzorků;
- **nativní štěpy kadaverózní**, které byly odebrány na patologii při pitvě a testovány do 48 hodin od úmrtí pacienta – celkem 9 vzorků;
- **pomalou rozmrazené kryoprezervované vzorky**, získané z TÚ FNHK, rozmrazeny pomocí standardního protokolu – v chladničce s řízeně zvyšovanou teplotou od 2 °C do 8 °C po dobu 120 minut – celkem 8 vzorků;
- **rychle rozmrazené kryoprezervované vzorky**, získané z TÚ FNHK, rozmrazeny rychlým způsobem ve vodní lázni o teplotě 37 °C během 5 minut – celkem 10 vzorků.

Celkem tak bylo k dispozici 32 vzorků humánních tepenných štěpů od 32 dárců. Před samotným testováním byl z konců každého vzorku odříznut tenký kroužek, jak ukazuje Obrázek 27. Tento kroužek byl rozstřížen a byly na něm změřeny základní rozměry potřebné pro další analýzu. Na pěti různých místech kroužků byla změřena tloušťka cévní stěny. Tloušťka H byla získána průměrem těchto naměřených hodnot. Kroužek byl poté rozstřížen, rozvinut do roviny a změřena jeho délka, tedy obvod tepenného štěpu. Z této hodnoty byl následně za předpokladu kruhového průřezu vzorků vypočítán střední poloměr vzorku R_m dle vztahu $R_m = O/2\pi$. Díky změřené tloušťce H bylo možné dopočítat i hodnoty vnějšího poloměru R_e a vnitřního poloměru R_i jako $R_{e,i} = O/2\pi \pm H$. Z medicínského pohledu je pro transplantace cévních štěpů nejdůležitějším rozměrem právě vnitřní poloměr R_i . Základní přehled rozměrů a typů tepenných štěpů uvádí Tabulka 1.

Experimentální část



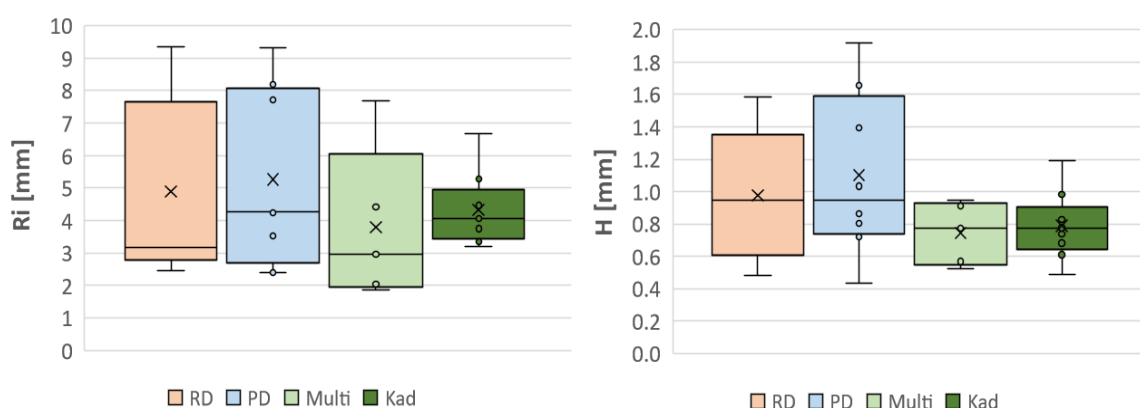
Obrázek 27 – Nativní vzorek ilické tepny s odříznutými kroužky pro měření tloušťky stěny a průměru vzorku

	Označení vzorku ČVUT	Typ štěpu anatomicky	Rozměry		Pohlaví, věk	
			Tloušťka stěny	Vnitřní poloměr		
			H [mm]	Ri [mm]		
Kryoprezervované štěpy	rychle rozmrazené	1RD	oblouk aorty a hrudní aorta	1.339	6.542	muž, 27 let
		2RD	oblouk a hrudní aorta	1.583	9.361	muž, 27 let
		5RD	oblouk a hrudní aorta	1.255	8.522	muž, 38 let
		6RD	hrudní aorta	1.399	7.352	muž, 41 let
		9RD	a.femoralis	0.483	2.446	žena, 36 let
		10RD	a.femoralis	1.153	2.846	muž, 61 let
		13RD	bifurkace aorty, ilické tepny	0.636	3.118	muž, 40 let
		14RD	bifurkace aorty, ilické tepny	0.671	2.798	muž, 40 let
		19RD	bifurkace aorty, ilické tepny	0.740	2.692	žena, 73 let
		20RD	bifurkace aorty	0.523	3.222	muž, 21 let
	pomalu rozmrazené	4PD	oblouk aorty	1.395	8.194	muž, 49 let
		8PD	hrudní aorta	1.919	7.712	muž, 37 let
		11PD	bifurkace aorty	0.721	4.248	muž, 27 let
		12PD	bifurkace aorty	0.432	2.403	muž, 27 let
		15PD	oblouk a hrudní aorta	1.657	9.324	muž, 65 let
		16PD	a.femoralis	1.034	2.398	muž, 61 let
		17PD	a.femoralis	0.803	3.524	muž, 67 let
		18PD	bifurkace aorty, ilické tepny	0.864	4.299	muž, 72 let
Multiorgán. odběry	29D	ilické tepny	0.947	4.407	muž, 53 let	
	30D	ilické tepny	0.773	2.968	muž, 53 let	
	31D	hrudní aorta	0.910	7.682	žena, 44 let	
	32D	a.femoralis	0.527	2.044	žena, 44 let	
	33D	a.femoralis	0.569	1.866	žena, 44 let	
Kadaverozní štěpy	37D	ilické tepny	0.610	3.352	muž, 46 let	
	38D	ilické tepny	0.682	3.520	muž, 46 let	
	39D	břišní aorta	1.191	6.677	muž, 46 let	
	43D	ilické tepny	0.738	4.631	muž, 76 let	
	44D	ilické tepny	0.799	4.461	muž, 76 let	
	46D	ilické tepny	0.488	3.208	muž, 76 let	
	47D	břišní aorta	0.982	5.286	muž, 70 let	
	49D	karotida	0.827	3.750	muž, 70 let	
	50D	karotida	0.777	4.068	muž, 79 let	

Tabulka 1 – Vzorky tepenných štěpů se zařazením do skupin, označením, anatomickou specifikací a základními rozměry a středními hodnotami základních rozměrů



Analýza rozměrů mezi jednotlivými zkoumanými skupinami byla provedena pomocí dvoustranného dvojvýběrového t-testu s nerovností rozptylů. Před provedením t-testu bylo zkontrolováno pomocí box plotů, zda v geometrických rozměrech nejsou mezi skupinami odlehlá pozorování, viz Obrázek 28. Při dvojvýběrovém t-testu se statisticky zkoumá podobnost nebo rozdílnost středních hodnot dvou výběrů, skupin dat. V tomto případě byla porovnávána tloušťka cévní stěny mezi každými dvěma zkoumanými skupinami. Stejně tak byly porovnávány i hodnoty vnitřního poloměru R_i mezi jednotlivými skupinami. Výsledek t-testu je reprezentován hodnotou pravděpodobnosti p-value. Hladina významnosti byla nastavena na 95 % (p-value = 0,05). Pokud je tedy výsledná hodnota p-value > 0,05, vychází nesignifikantní rozdíl mezi středními hodnotami zkoumaných výběrů, můžeme tedy rozdíl mezi středními hodnotami uvažovat jako statisticky nevýznamný. Dle takto nastaveného t-testu se mezi sebou zkoumané skupiny signifikantně neliší (p-value > 0,05) ani v jednom z rozměrů vzorků, viz Tabulka 2.



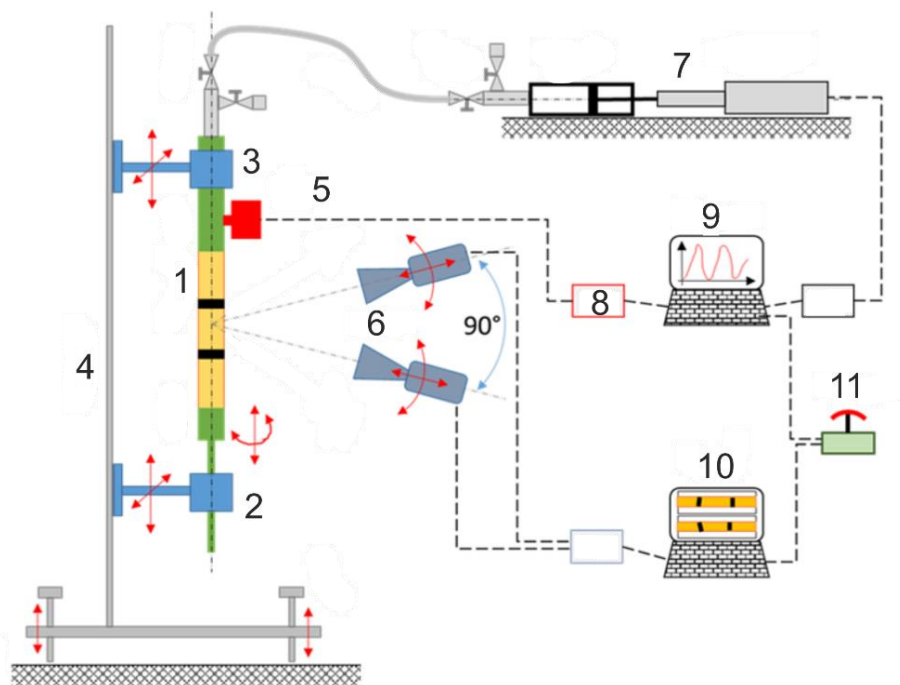
Obrázek 28 – Porovnání rozměrů jednotlivých skupin zkoumaných tepenných štěpů, vlevo vnitřní poloměr R_i , vpravo tloušťka stěny H

Hodnoty pravděpodobnosti p	R_i [mm]	H [mm]
RD-PD	✓ 0.7778	✓ 0.5816
RD-Multi	✓ 0.4459	✓ 0.1568
RD-Kad	✓ 0.5611	✓ 0.2153
PD-Multi	✓ 0.3340	✓ 0.1033
PD-Kad	✓ 0.3905	✓ 0.1357
Multi-Kad	✓ 0.6571	✓ 0.7043

Tabulka 2 – Výsledky oboustranných dvojvýběrových t-testů s nerovností rozptylů mezi zkoumanými skupinami vzorků; žádná porovnávaná skupina se signifikantně neliší při hladině významnosti $p = 0,05$

9.2 Testování a jejich vyhodnocení

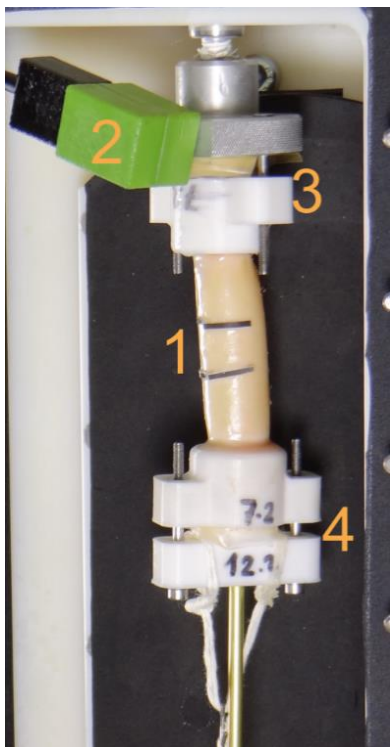
K testování mechanických vlastností byla využita metoda inflačně-extenzních testů. V případě této práce byly testy provedeny podle schématu, viz Obrázek 29. Testovaný vzorek byl sevřen vertikálně mezi upínací trny, z nichž jeden byl nepohyblivý a druhý umožňoval vzorku pohyb v axiálním směru a krut okolo podélné osy vzorku, viz Obrázek 29. Okruh byl uzavřený. Do upnutého vzorku byla pulsátorem cyklicky pumpována voda, která vytvářela vnitřní tlak a simulovala pulsaci krve. Rychlost posuvu pístu pulsátoru, a tedy i rychlost zatěžování vzorku byla řízena počítačem. Vnitřní tlak byl snímán pomocí tlakového modulu KTS (rozsah 0–28 kPa, frekvence snímání 600 Hz), který byl s počítačem propojen přes analogově-digitální převodník. Průběh deformování vzorků, tj. geometrie vzorků při zatěžování, byl snímán dvěma kamerami Basler acA2500 s rozlišením 2592–2049 px (5.3 Mpx), které byly vzájemně pootočené o 90° kolem vzorku, viz Obrázek 29. Kamery snímaly obraz s frekvencí 10 Hz, při každém testu tak bylo jednou kamerou nasnímáno okolo 3 000 snímků. Pro společné zahájení snímání obrazu dvěma kamerami a snímání tlaku tlakovým senzorem bylo použito synchronizační tlačítko. To do systému vyslalo skokový napěťový signál 5 V. Pro lepší detekci značek na vzorcích a detekci obrysů vzorků byly po celou dobu experimentů tepny osvětlovány výkonnými světly. Pro detekci změny délky vzorku v axiálním směru byly ve střední části



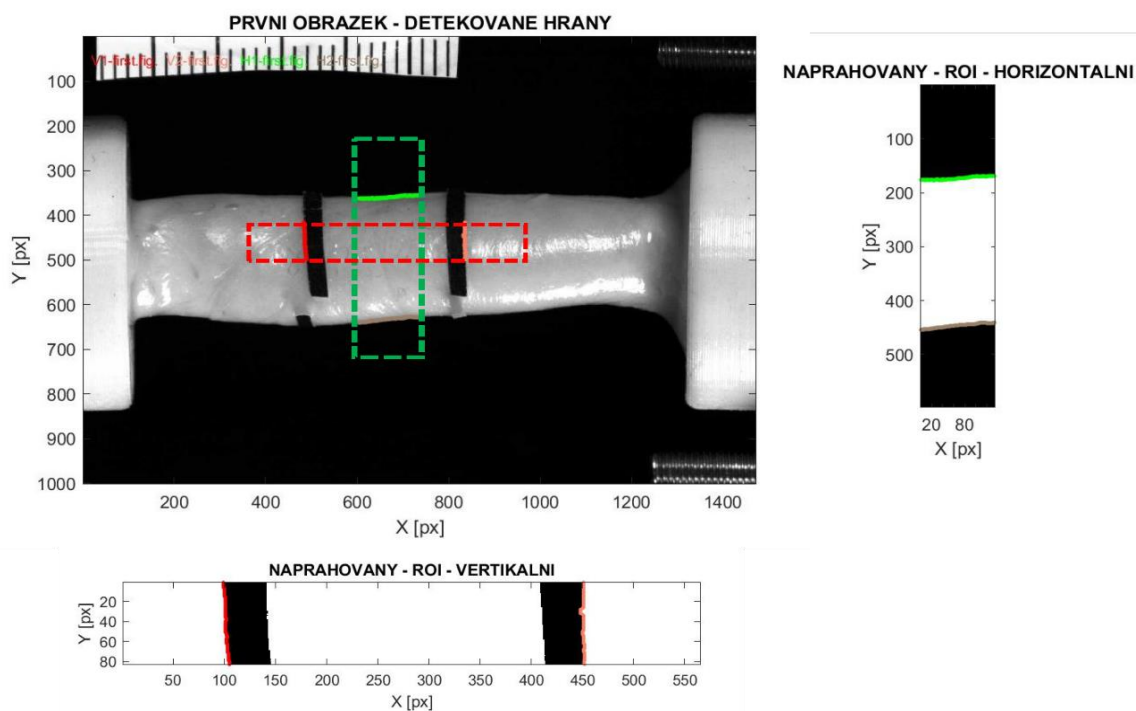
Obrázek 29 – Schéma aparatury inflačně-extenzních testů; 1 – tepenný štěp; 2 – spodní pohyblivý upínací trn; 3 – horní pevný upínací trn; 4 – stojan; 5 – tlakový senzor; 6 – vysokofrekvenční kamery; 7 – pulsátor; 8 – analogově-digitální převodník; 9 – měřicí a řídicí počítač tlak. senzoru a pulsátoru; 10 – Měřicí počítač kamer. systému; 11 – synchronizační tlačítko



vždy nalepeny značky, viz Obrázek 29 a Obrázek 30. Pro detekci změny rozměru v obvodovém směru, tedy obrys tepny, bylo za nasvícený vzorek umístěno kontrastní černé pozadí.



Obrázek 30 – Detail testovací aparatury inflačně-extenzního testu; 1 – testovaný tepenný štěp s nalepenými značkami v horizontálním směru; 2 – tlakový senzor; 3 – horní nepohyblivý upínací trn; 4 – spodní pohyblivý upínací trn

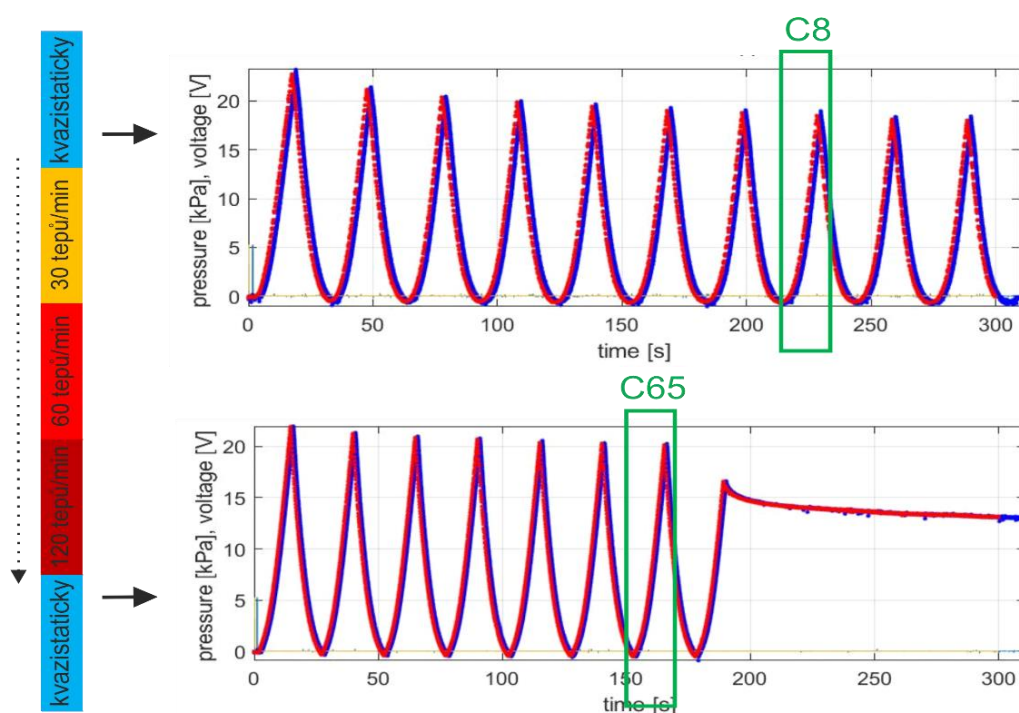


Obrázek 31 – Ukázka detekování hran v ROI a převedení snímků na binární mapu v prostředí Matlab

Experimentální část

K získání dat o změně rozměrů v obvodovém a axiálním směru bylo použito prostředí programu Matlab. Získané snímky vzorků během zatěžování byly v odstínech šedi. Pomocí algoritmu v Matlabu byly naprahovány a převedeny na binární mapu. Umístěné značky a kontrastní černé pozadí se pak jevily jako černé a osvětlený vzorek jako bílý, viz Obrázek 31.

Díky rozhraní černé a bílé tak mohlo dojít k detekci hran na každém snímku z obou kamer. Pro detekci hran byly na vzorku vybrány tzv. oblasti zájmu ROI (region of interest), viz Obrázek 31. Časová změna vzdálenosti hran od sebe ve vertikálním a horizontálním směru pak odpovídala změnám rozměrů v obvodovém a axiálním směru. Detekované hrany, nyní již úsečky, viz Obrázek 31, sestávaly z několika desítek až stovek bodů. Pro výpočet deformací v obvodovém i axiálním směru, byly použity střední (průměrné) vzdálenosti hran v každém snímku. Získaná data o změnách rozměrů v ROI byla navíc průměrována z obou kamer, neboť tepenné štěpy nebyly striktně válcovitého tvaru. Průměrováním dat z těchto dvou kamer je tak snížena nepřesnost měření. Také byl stanoven předpoklad, že v oblasti střední části vzorků, kde jsou ROI, se tepny deformují



Obrázek 32 – Průběh tlaku a vyznačení 8. a 65. cyklu, vlevo znázornění posloupnosti zatěžovacích rychlostí

jako válec kruhového průřezu [35]. V této práci byla zkoumána mechanická odezva při kvazistatickém zatěžování tepenných štěpů a zároveň při nulovém vnějším axiálním zatížení. Rychlost posuvu pístu pulsátoru byla 0,1 mm/s. Tomu odpovídala frekvence pulsace při kvazistatickém zatěžování – 0,05 Hz. Jeden cyklus v závislosti na maximálním dosaženém tlaku trval cca 30 s. Vnitřní tlak cyklicky narůstal s frekvencí 0,05 Hz. Každý vzorek byl nejdříve předcyklován 7 cykly, aby došlo k ustálení zatěžovací křivky viskoelastického materiálu, jak popisují kapitola 5.2 a Obrázek 15. Vyhodnocována byla

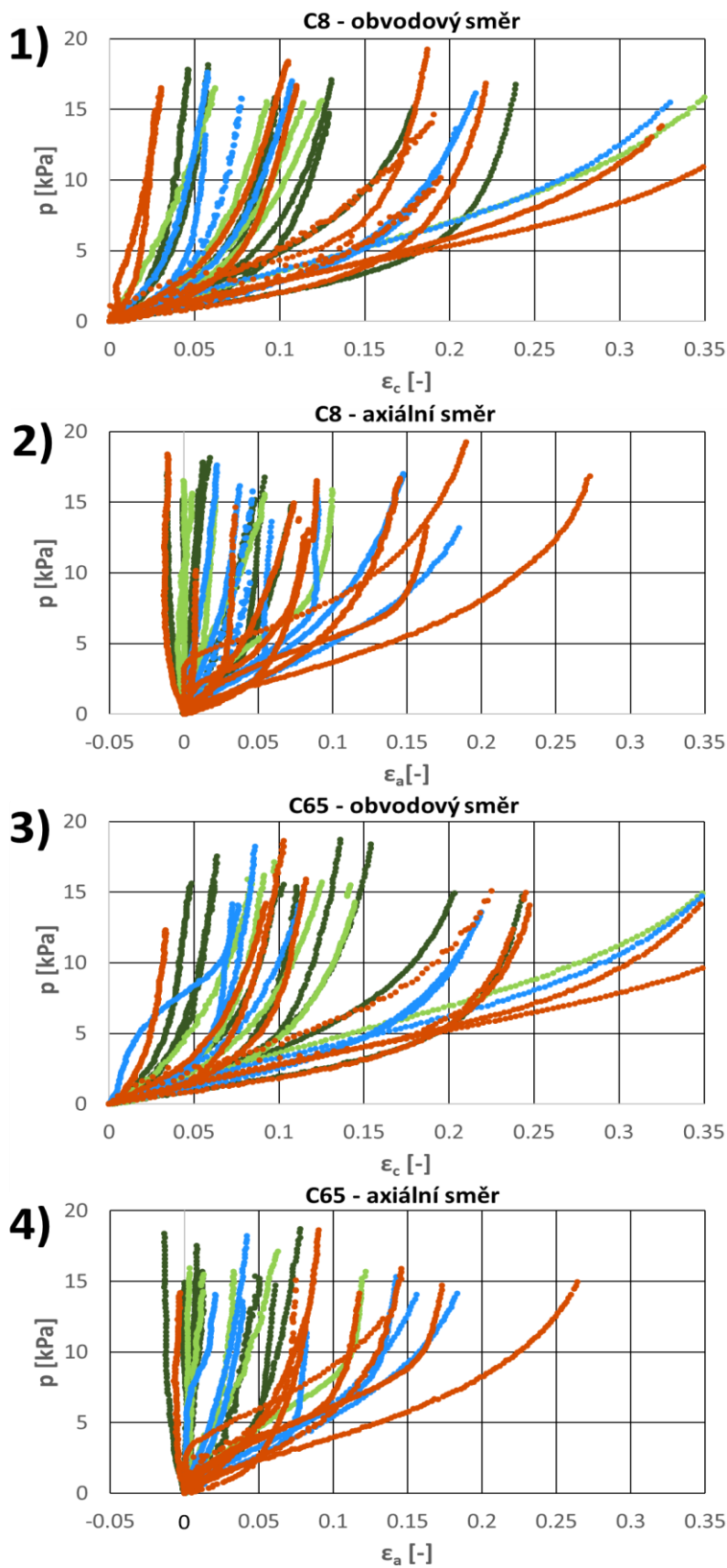


zatěžující fáze 8. cyklu kvazistatického zatěžování, viz Obrázek 32. Vzorek byl poté postupně zatěžován rychlostmi simulujícími 30, 60 a 120 tepů za minutu (tedy 0,5 Hz, 1 Hz a 2 Hz) a nakonec opět kvazistaticky. Při konečném kvazistatickém zatěžování byl vyhodnocen 65. cyklus od počátku celého testování, viz Obrázek 32. Na tomto 65. cyklu bylo možné pozorovat vliv násobného cyklického zatěžování při porovnání s výsledky z 8. cyklu.

Díky vzestupné (náběžné) hraně signálu ze synchronizačního tlačítka bylo provedeno sfázování tlaku a snímků z kamer. Frekvence snímání tlaku a obrazu byla rozdílná. Každému snímku (dva snímky ze dvou synchronně běžících kamer) byla přiřazena jediná správná hodnota tlaku uvnitř vzorku, tedy zatížení.

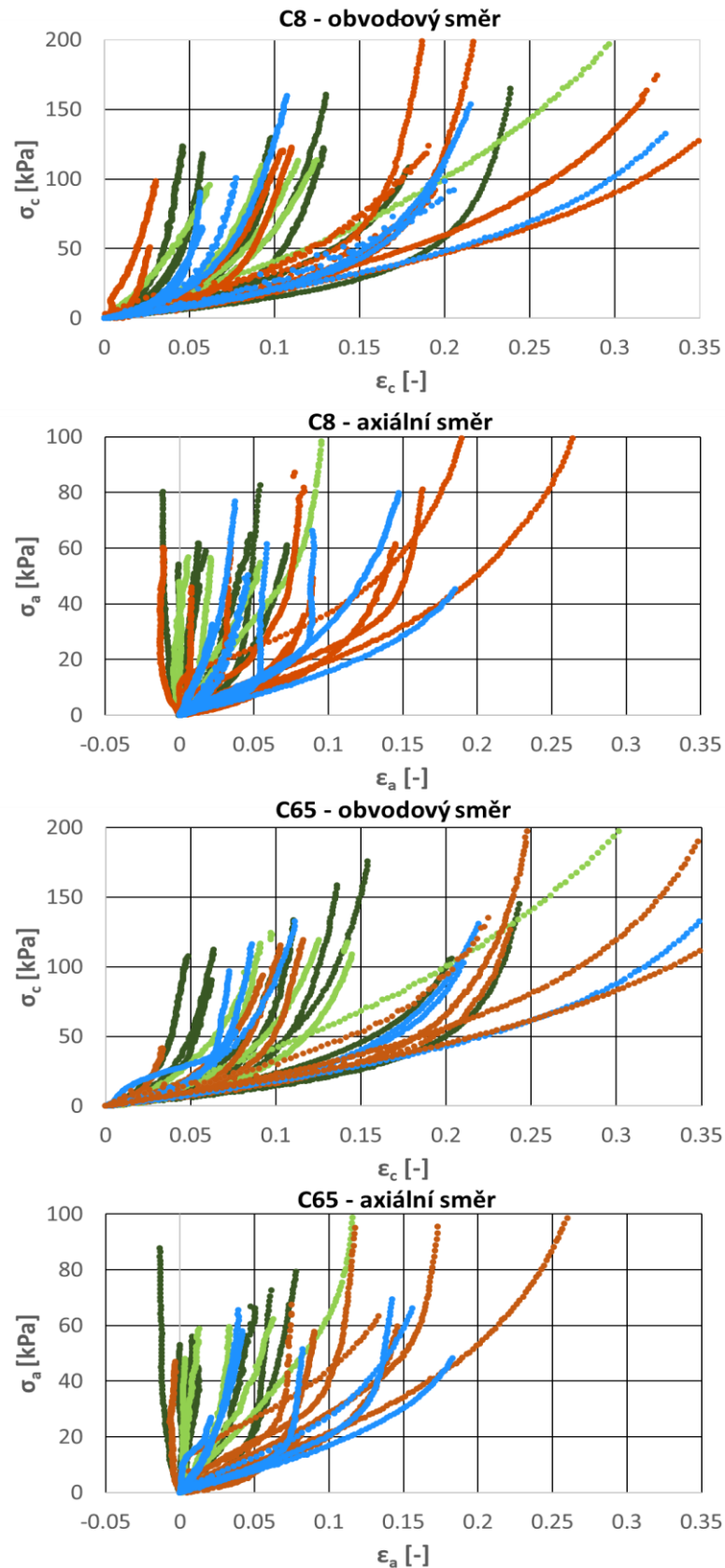
Po sfázování záznamu tlaku a snímků z kamer, které byly podrobeny detekci hran, byla k dispozici data o referenčním a okamžitém poloměru a referenční a okamžité délce vzorku v ROI pro danou hodnotu vnitřního tlaku. Bylo tak možné vypočítat deformace v obvodovém směru dle vztahu (3) a v axiálním směru dle vztahu (4). Pro jednotlivé vzorky pak mohly být vyneseny charakteristiky v závislosti tlak-deformace pro 8. a 65. cyklus při kvazistatickém zatěžování, viz Obrázek 33.

Pro technickou praxi a z hlediska namáhání cévní stěny je určujícím údajem napětí vyvolané vnitřním tlakem. Charakteristiky v závislosti tlak-deformace nezohledňují geometrické rozměry zkoumaných vzorků. Stejný vnitřní tlak tak může u vzorků s odlišnou geometrií a s odlišným poměrem D_m/H vyvolat různě veliká napětí. Z toho důvodu je potřeba pro relevantní závěry práce zkoumat charakteristiky v závislosti napětí-deformace. Vzorky tepenných štěpů byly uvažovány jako válcové skořepiny s kruhovým průřezem. K získání hodnot napětí v obvodovém a axiálním směru tak byla využita teorie válcových skořepin kruhového průřezu, která je podrobněji popsána v kapitole 8. Vzorky tepenných štěpů zkoumané v této práci splňují předpoklady pro užití zmíněné teorie. Mezi ně patří především vhodný poměr mezi středním průměrem D_m a tloušťkou cévní stěny H . Tento poměr by pro válcovou skořepinu měl být 10:1 a vyšší. Průměrná hodnota daného poměru u všech zkoumaných vzorků byla přibližně 11,1:1. Další předpoklady pro užití této teorie uvádí kapitola 8. Pro výpočet napětí v obvodovém směru byl použit vztah (13), pro napětí v axiálním směru vztah (11). Po aplikaci teorie válcových skořepin kruhového průřezu mohlo dojít k vnesení zatěžovacích křivek v závislosti napětí-deformace všech vzorků během 8. a 65 cyklu při kvazistatickém zatěžování, viz Obrázek 34. Při porovnání Obrázek 33 a Obrázek 34, tedy charakteristik v závislostech tlak-deformace a napětí deformace jsou patrné zásadní posuny charakteristik některých vzorků z důvodu odlišných geometrických rozměrů.



● multiorganové odběry ● kadaverózní ● pomalu rozmrazené ● rychle rozmrazené

Obrázek 33 – Zatěžovací křivky tlak-deformace všech vzorků všech skupin pro 8. cyklus (C8 – 1 a 2) a 65. cyklus (C65 – 3 a 4) v obvodovém a axiálním směru

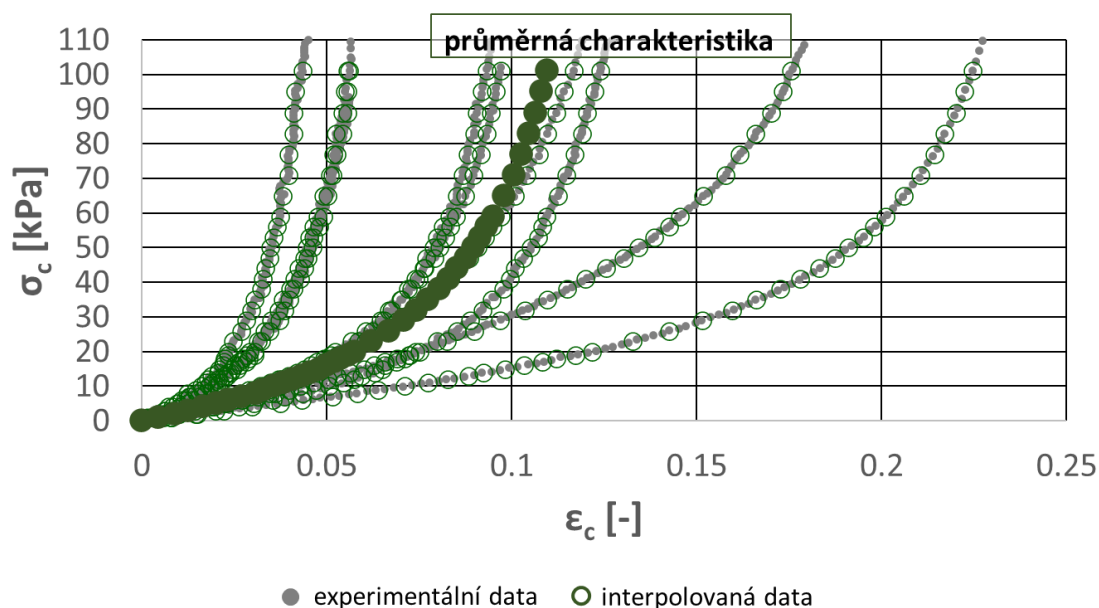


● multiorganové odběry ● kadaverózní ● pomalu rozmrazené ● rychle rozmrazené

Obrázek 34 – Zatěžovací křivky napětí-deformace všech vzorků všech skupin pro 8. cyklus (C8 – 1 a 2) a 65. cyklus (C65 – 3 a 4) v obvodovém a axiálním směru

Experimentální část/Výsledky

Díky většímu množství dat mohlo být přistoupeno k vytvoření reprezentativní průměrné charakteristiky pro jednotlivé zkoumané skupiny v obvodovém a axiálním směru, viz Obrázek 35. Každá experimentálně získaná charakteristika byla proložena interpolovanými daty s jednotným krokem. Došlo tedy k převzorkování dat charakteristik. Tato interpolovaná data pak byla na konkrétních hodnotách napětí zprůměrována a byla tak vytvořena reprezentativní průměrná charakteristika, viz Obrázek 35. Převzorkování mohlo být provedeno jen do hodnot napětí, na kterých byla dostupná data pro všechny vzorky dané skupiny (v obvodovém směru zhruba do hodnoty 100 kPa, v axiálním směru do hodnoty 50 kPa). Jedině pak reprezentovala průměrná charakteristika skutečně všechny vzorky dané skupiny. Interpolace experimentálních dat je jednodušší variantou k převzorkování a dala by se nahradit aplikací materiálového modelu pro hyperelastické anizotropní materiály, jak je učiněno v práci [2]. Reprezentativní charakteristiky pak slouží k znázornění mechanické odezvy celé vybrané skupiny vzorků. V jednom grafu se tak dá zkoumat odezva skupin vzorků v obvodovém i axiálním směru, což je výhodné pro stanovení závěrů práce.



Obrázek 35 – Znázornění získání reprezentativní průměrné charakteristiky pomocí interpolace experimentálních dat, v tomto případě v obvodovém směru kadaverózních nativních vzorků



10 Výsledky

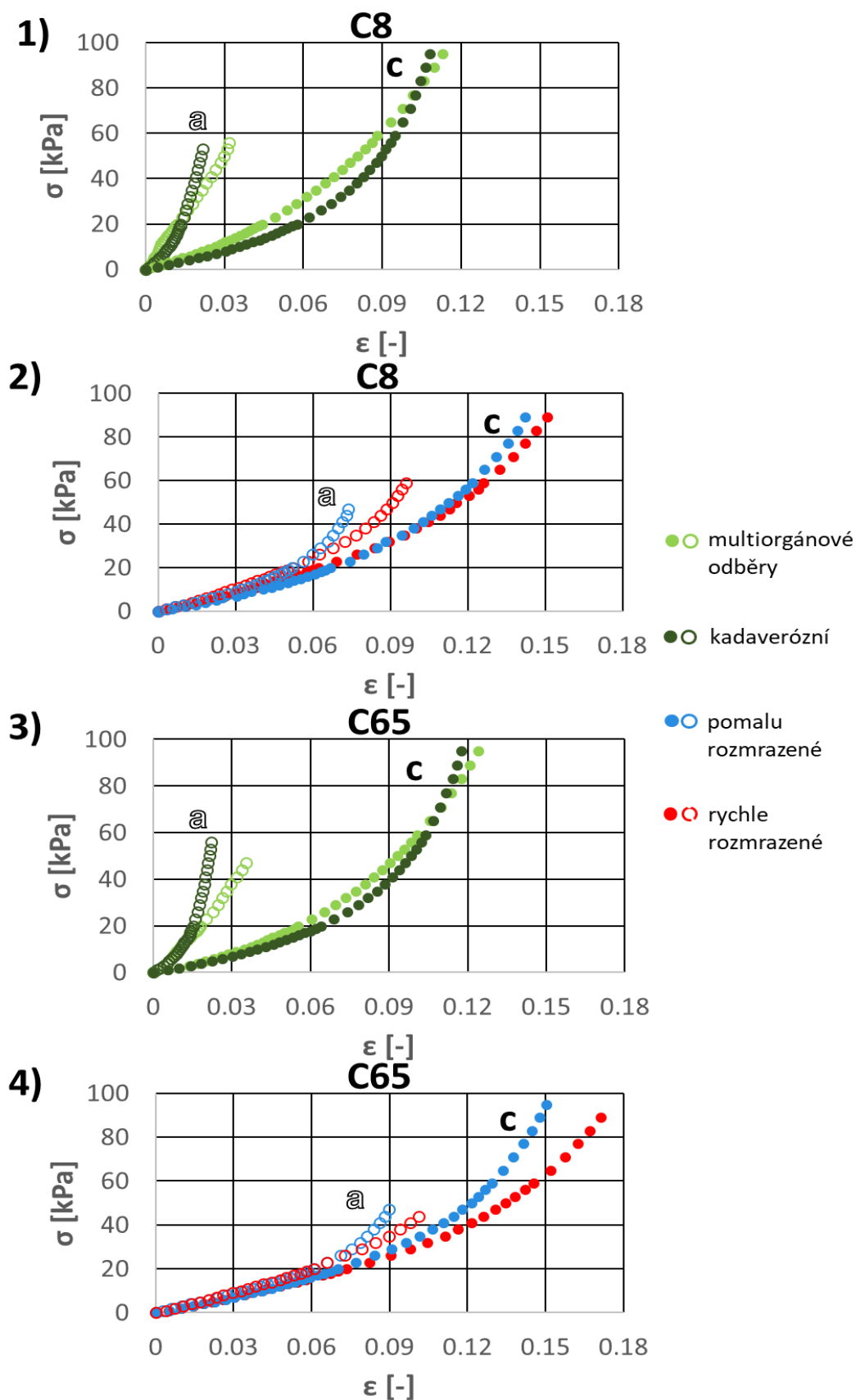
Ze všech provedených inflačně-extenzních testů byly vyhodnoceny zatěžující části 8. a 65. cyklu při kvazistatickém zatěžování bez vnějšího axiálního předpětí, viz Obrázek 34. U dvou vzorků (2RD, 4PD) nebyla získána data pro 65. cyklus zatěžování. Vzorky selhaly kvůli skrytým perforacím v tepenné stěně. Charakteristiky napětí-deformace a tlak-deformace pro jednotlivé skupiny vzorků jsou uvedeny v dodatku, viz Obrázek 39, Obrázek 40, Obrázek 41, Obrázek 42. Ukázka zjednodušení charakteristik jednotlivých vzorků pomocí interpolace experimentálních dat na průměrné reprezentativní charakteristiky jednotlivých skupin vzorků pro 8. a 65. cyklus je ukázána na Obrázek 35.

Z těchto reprezentativních charakteristik na Obrázek 36 lze vyčíst, že vzorky všech čtyř zkoumaných skupin vykazovaly při inflačně-extenzních testech vyšší deformace v obvodovém směru v porovnání s axiálním směrem.

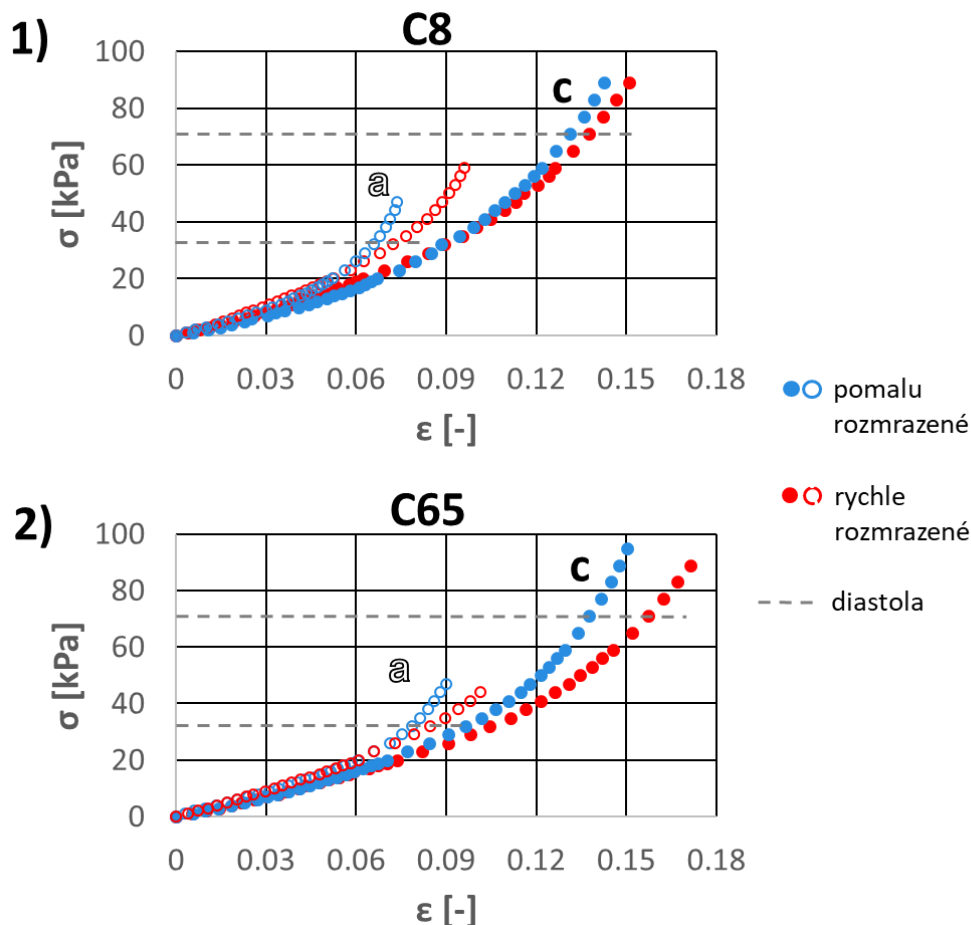
Při pohledu na nativní skupiny vzorků na Obrázek 36.1 a Obrázek 36.3 je viditelný rozdíl v mechanické odezvě mezi vzorky ze skupiny multiorgánových odběrů a kadaverózních štěpů. Skupina kadaverózních štěpů vykazuje v obou směrech větší sklon směrnice charakteristiky, a tedy vyšší tuhost při vyšších hodnotách napětí.

Pomalou a rychle rozmrazené vzorky vykazují podobné vlastnosti. Zatěžovací křivky se v obvodovém i axiálním směru téměř překrývají přibližně do hodnoty napětí, které odpovídá hodnotě diastolického tlaku, viz Obrázek 37. Tato hodnota napětí pak odpovídá tlaku cca 10,7 kPa a je v charakteristice napětí-deformace pro obvodový i axiální směr vyznačena na Obrázek 37. Je patrné, že nad touto hodnotou se průměrné charakteristiky rozcházejí. Rychle rozmrazené vzorky se při stejném zatížení deformují více oproti pomalu rozmrazeným vzorkům.

Při porovnání charakteristických křivek z Obrázek 36.1 a Obrázek 36.2 s Obrázek 36.3 a Obrázek 36.4 lze vyčíst vliv násobného cyklického zatěžování na mechanickou odezvu tepenných štěpů. Zde je rozdíl mezi odezvou v 8. a 65. cyklu při kvazistatickém zatěžování patrný u všech skupin vzorků. Nejvýraznější je pak u skupin kryoprezervovaných vzorků, viz Obrázek 36.2 a Obrázek 36.4. Při 65. cyklu dochází k poměrně vyšším deformacím u všech skupin vzorků. Tento trend je nejzřetelnější u kryoprezervovaných vzorků jak v obvodovém, tak i v axiálním směru.

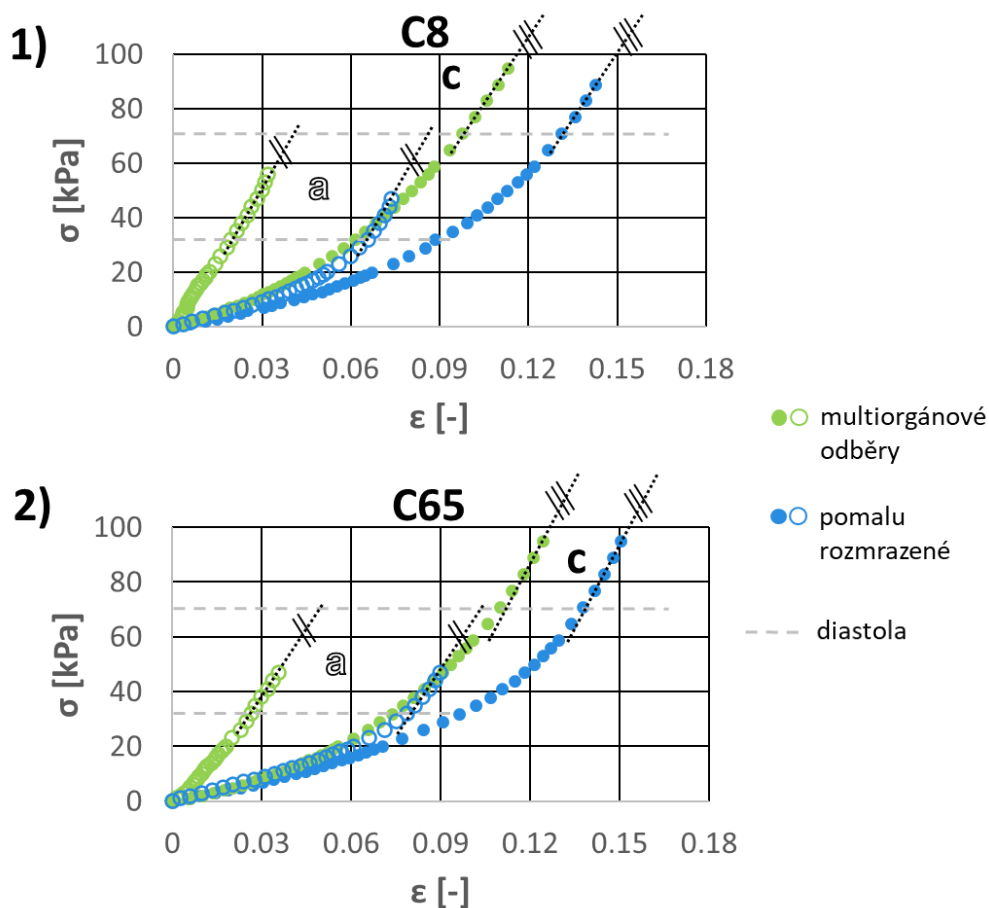


Obrázek 36 - Reprezentativní průměrné charakteristiky získané pomocí interpolace pro 8. cyklus kvazistatického zatěžování – skupiny nativních vzorků (1) a skupiny kryoprezervovaných vzorků (2); pro 65. zatěžovací cyklus – skupiny nativních vzorků (3) a skupiny kryoprezervovaných vzorků (4); kde (a) – axiální směr; (c) – obvodový směr



Obrázek 37 – Porovnání reprezentativních charakteristik kryoprezervovaných skupin vzorků pro 8. a 65. cyklus (1 a 2) při kvazistatickém zatěžování, vyznačena hodnota napětí odpovídající diastolickému tlaku (diastola), na které se charakteristiky rychle a pomalu rozmrazené skupiny začínají odchylovat od sebe, (a) – axiální směr; (c) – obvodový směr

Důležitým výsledkem této práce je výrazný nárůst deformace u kryoprezervovaných vzorků oproti vzorkům nativním, jak je vidět na Obrázek 36. Vyšší deformace jsou patrné u obou skupin kryoprezervovaných vzorků, především pak u rychle rozmražených, viz Obrázek 36.2 a Obrázek 36.4. Výrazný nárůst deformace je v porovnání s nativními vzorky znatelný především v axiálním směru kryoprezervovaných vzorků. Zatěžovací křivky v axiálním a obvodovém směru jsou si u skupin kryoprezervovaných vzorků výrazně bližší oproti skupinám nativních vzorků. Mechanická odezva v axiálním směru kryoprezervovaných vzorků se dokonce blíží odezvě nativních vzorků v obvodovém směru.



Obrázek 38 – Podobnost trendů charakteristik skupin vzorků z multiorganových odběrů a vzorků pomalu rozmrazených nad hodnotou diastolického tlaku pro 8. cyklus (1) a 65. cyklus (2) kvazistatického zatěžování, (a) – axiální směr; (c) – obvodový směr

Porovnáním zatěžovacích křivek pro skupinu vzorků z multiorganových odběrů a pomalu rozmrazených vzorků je možné zjistit podobnost trendu křivek při vyšším napětí. Zatěžovací křivky těchto skupin vykazují nad hodnotou napětí, které odpovídá diastolickému tlaku, podobné směrnice charakteristik. Tato podobná odezva pro tyto dvě skupiny platí v obvodovém i axiálním směru pro 8. i 65. cyklus, jak je patrné z Obrázek 38. Pomalu rozmrazené vzorky pouze dosahují vyšších deformací při nižším napětí oproti nativním vzorkům z multiorganových odběrů.



11 Diskuze

Výsledky této práce navazují na dlouhodobý výzkum vlivu kryoprezervace na mechanické vlastnosti cévních štěpů. V předcházejících pracích byl zkoumán vliv kryoprezervace a vliv rychlosti zatěžování převážně na mechanické vlastnosti žil – konkrétně VSM, viz např. [2, 26, 39]. V této práci se jednalo o zkoumání vlivu kryoprezervace na tepenné štěpy a o porovnání s mechanickou odezvou nativních tepenných štěpů při kvazistatickém zatěžování. Zkoumán byl vliv rychlosti rozmrazení kryoprezervovaných tepenných štěpů na mechanické vlastnosti. Porovnávala byla skupina vzorků rozmrazených pomalu dle standardního protokolu (120 minut při 2–8 °C) a skupina vzorků rozmrazených rychlým způsobem (5 minut ve vodní lázni o teplotě 37 °C). Mechanické odezvy kryoprezervovaných vzorků byly porovnány s odezvou nativních vzorků získaných z multiorgánových odběrů a z kadaverů. K získání mechanické odezvy byly analyzovány inflačně-extenzní testy při kvazistatické rychlosti zatěžování s nulovým vnějším axiálním předpětím. Pro výpočet napětí ve vzorcích byla aplikována teorie tenkostěnných válcových skořepin. K vytvoření reprezentativních charakteristik jednotlivých skupin vzorků v obvodovém i axiálním směru byla použita metoda interpolace experimentálních dat. Provedeno bylo převzorkování dat s jednotným krokem a následné průměrování na stejných hodnotách napětí. Toto je jednodušší způsob získání reprezentativních křivek než aplikace matematického modelu, ale vzhledem k většímu počtu zkoumaných vzorků – 32 vzorků od 32 dárců – může mít i průměrování interpolovaných dat dobrou výpovědní hodnotu.

Zkoumané vzorky tepenných štěpů v této práci byly odlišných anatomických typů. Porovnávaly tak mezi sebou byly rozměrově a do jisté míry i strukturně rozdílné tepny, např. hrudní aorta a a. femoralis, viz Tabulka 1. Právě proto byla provedena analýza důležitých geometrických rozměrů vzorků: tloušťky cévní stěny a vnitřního poloměru. Dle t-testů, které porovnávaly tyto rozměry mezi jednotlivými skupinami vzorků, se nevyskytly signifikantní odlišnosti ve zkoumaných rozměrech. Zároveň byl ověřen vyhovující poměr středního průměru a tloušťky stěny, aby mohla být aplikována teorie válcových skořepin kruhového průřezu (poměr 10:1 a vyšší). Zkoumané skupiny vzorků tak mezi sebou mohly být porovnány. Pro zvýšení objektivity by však měly být porovnávaly štěpy anatomicky stejného typu tepny a dárců v určitém věkovém rozpětí, s detailním popisem zdravotního stavu dárce. Vzhledem k složitosti získávání cévních štěpů k experimentálnímu testování jde však o poměrně náročné požadavky.

Počet vzorků jednotlivých zkoumaných skupin byl pro získání výsledků uspokojivý, viz Tabulka 2. Pouze u nativních vzorků z multiorgánových odběrů bylo pracováno jenom s pěti vzorky. Na základě mechanické odezvy těchto vzorků byla stanovena průměrná charakteristika této skupiny, je však potřeba přihlídnout k relativně

Diskuze

malému počtu vzorků této skupiny, což může mít negativní vliv na výpovědní hodnotu reprezentativní charakteristiky.

Při porovnání reprezentativních charakteristik pro kryoprezervované a nativní vzorky na Obrázek 36 je patrný výrazný nárůst deformace u kryoprezervovaných skupin vzorků v axiálním i obvodovém směru oproti nativním vzorkům. Charakteristiky v obvodovém a axiálním směru u kryoprezervovaných skupin vzorků jsou si vzájemně velmi podobné – průběhy charakteristik se k sobě přibližují. Tím se liší od nativních vzorků, kde je patrný vliv anizotropie materiálu – výrazný rozdíl mezi trendy charakteristik ve zkoumaných směrech navzájem. Můžeme konstatovat, že kryoprezervace má vliv na nárůst poddajnosti v obvodovém, a především v axiálním směru, a tedy na pokles míry anizotropie u tepenných štěpů. Tento výsledek koresponduje s výsledky prací [2, 39]. Výsledky práce [2] komentují rozdíl mezi odezvou nativních a kryoprezervovaných vzorků VSM v axiálním směru. Dle [2] dochází u nativních vzorků v axiálním směru k velmi malým deformacím nebo deformacím v záporných hodnotách, naopak kryoprezervované vzorky VSM se v axiálním směru téměř výhradně prodlužují. Tento poznatek souhlasí s výsledky této práce, viz dodatek – Obrázek 40 a Obrázek 42, kde jsou znázorněny charakteristiky jednotlivých skupin v axiálním směru. Je otázkou, jak přesně kryoprezervace ovlivňuje změnu struktury tepenné stěny. Nárůst deformace při vyšším napětí je pozvolnější než u nativních vzorků, viz Obrázek 36.1 a Obrázek 36.2. Za tužší odezvu při vyšších napětí u nativních vzorků zodpovídají svazky kolagenu se svými mechanickými vlastnostmi, viz Obrázek 10. Subjektivní hypotézou je, že mohlo při kryoprezervaci dojít k narušení právě struktury kolagenních svazků v cévní stěně. Změny ve struktuře kolagenních vláken a buněk hladké svaloviny v tepenné stěně během kryoprezervace popisuje práce [40], není zde však přímo potvrzena souvislost mezi změnou struktury kolagenních vláken a zvýšení poddajnosti cévní stěny.

Pomalou a rychle rozmrazené vzorky vykazují podobné charakteristiky v obou zkoumaných směrech přibližně do hodnoty diastolického tlaku, jak ukazuje Obrázek 37. V oblasti pracovního zatížení – nad hodnotou diastolického tlaku – začínají být rychle rozmrazené vzorky poddajnější a dosahují vyšších deformací. Rychlý způsob rozmrazení tak může mít zásadnější (negativní) vliv na změnu struktury tepenné stěny oproti pomalému rozmrazení. Porovnáním vlivu rychlosti rozmrazení kryoprezervovaných tepen se zabývaly studie [33, 41, 42] – konkrétně zkoumaly postupně lidské ilické tepny, lidský kořen aorty a králičí karotidy. Snímky z elektronového mikroskopu v [41, 42] odhalily morfologické změny v cévní stěně oproti nativním tepenným štěpům. U rychle rozmrazených vzorků však byly tyto změny markantnější [41]. Jednalo se především o ztrátu vrstvy endothelia, lehké smrštění buněk hladké svaloviny a o poškození bazální laminy [41]. Právě tato narušení cévní stěny mohou být příčinou rozdílnosti mechanické odezvy pomalu a rychle rozmrazených vzorků i v této práci.

Součástí práce [41] bylo i uniaxiální testování vzorků, které však mělo za výsledek nesignifikantní odlišnosti v mechanické odezvě pomalu a rychle rozmrazených štěpů



ilických tepen. V rámci této práce byly zkoumány výsledky inflačně-extenzních testů, které simulují zatěžování cév dokonaleji než uniaxiální testování. Na základě výsledků této práce lze konstatovat, že se pomalu a rychle rozmrazené kryoprezervované vzorky v mechanické odezvě odlišují, viz Obrázek 37.

Studie [33] potvrdila zvýšený výskyt narušení cévní stěny v obvodovém směru při rychlém způsobu rozmrazení. Poškození cévní stěny dle [33] pak může mít původ v příliš rychlé devitrifikaci biologického materiálu při rozmrazení, kdy vznikají v materiálu vysoká pnutí. Při překonání procesu devitrifikace pomalejší rychlostí rozmrazení byla pozorována výrazně menší míra poškození cévní stěny [33].

Kryoprezervované štěpy VSM zkoumaly práce [2, 39, 43]. V práci [2] byl zkoumán vliv rychlosti zatěžování na mechanickou odezvu VSM. Dle [2] pomalý způsob rozmrazení nezpůsobuje výraznou změnu v mechanické odezvě v obvodovém směru při žádné rychlosti zatěžování. Rychle rozmrazené vzorky VSM vykazovaly při vyšších rychlostech zatěžování výrazně odlišnou mechanickou odezvu oproti nativním vzorkům, a jsou tak pravděpodobně kryoprezervací ovlivněny více než pomalu rozmrazené vzorky [2]. Toto souhlasí i s výsledky této práce. Kvazistatické zatěžování kryoprezervovaných vzorků VSM je popsáno v práci [39]. Zde je uvedeno, že jsou hodnoty deformací rychle a pomalu rozmrazených vzorků VSM při kvazistatickém zatěžování velmi podobné. Při zkoumání morfologických změn ze snímků elektronového mikroskopu po pomalém a rychlém rozmrazení vzorků VSM v práci [43] nebyly patrné zásadní rozdíly ve změnách struktury cévní stěny mezi těmito dvěma způsoby rozmrazení.

Větší míra narušení struktury rychlým způsobem rozmrazení může být patrná také z vlivu násobného cyklického zatěžování. Při něm došlo u rychle rozmrazených vzorků k poměrně většímu nárůstu poddajnosti oproti pomalu rozmrazeným vzorkům, jak je patrné při porovnání Obrázek 37.1 a Obrázek 37.2. Tento jev byl pozorován i v práci [39]. U nativních vzorků není vliv násobného cyklického zatěžování oproti kryoprezervovaným skupinám vzorkům příliš zřetelný.

Při porovnání reprezentativních charakteristik pomalu rozmrazených vzorků s nativními vzorky z multiorgánových odběrů je patrná podobná odezva cca nad hodnotou diastolického tlaku, viz Obrázek 38 – směrnice charakteristik jsou podobné. Můžeme mluvit o podobné tuhosti těchto dvou skupin při odlišných hodnotách deformací. Rozmrazení pomalým způsobem má dle tohoto výsledku vliv na zvýšení dilatace vzorku při zatížení. Toto je velmi příznivý výsledek pro standardní protokol rozmrazování. Pokud by se tedy při implantaci pomalu rozmrazeného tepenného alotransplantátu předem počítalo s jeho dilatací při zatížení, např. zvolením menšího průměru štěpu, po ustálení mechanických vlastností štěpu by mohl tento kryoprezervovaný štěp vykazovat stejné chování jako nativní tepenný štěp.

Zkoumané byly dvě skupiny nativních vzorků – tepenné štěpy z multiorgánových odběrů a z kadaverů. Při porovnání těchto dvou skupin mezi sebou je patrné, že kadaverózní vzorky mají při vyšším zatížení v obou směrech tužší odezvu, viz Obrázek

Diskuze/Závěr

36.1 a Obrázek 36.3. To může být způsobeno rozdílnou dobou uplynulou od úmrtí pacienta, vyoperování štěpů až do jejich zpracování v laboratoři. U vzorků z multiorgánových odběrů to byl časový interval mezi úmrtím a testováním zhruba 12 hodin, u kadaverózních vzorků byl tento interval asi dvojnásobný. Tato větší časová prodleva oproti vzorkům z multiorgánových odběrů může být příčinou větší tuhosti kadaverózních vzorků. Vliv na vyšší tuhost kadaverózních vzorků mohl mít také vyšší průměrný věk pacientů. U skupiny kadaverózních vzorků byl průměrný věk pacientů 65 let, u skupiny vzorků z multiorgánových odběrů pouze 48 let. Vliv vyššího věku na nárůst tuhosti cévní stěny popisuje práce [44].

Zajímavým zjištěním po vynesení charakteristik všech vzorků do grafu bylo patrné rozdělení vzorků do dvou skupin – s tužší a poddajnější odezvou v obvodovém směru. Tento jev lze pozorovat na Obrázek 34.1 a Obrázek 34.3. V dodatku na Obrázek 43 jsou zvýrazněny uvedené dvě skupiny vzorků a viditelná mezera mezi nimi. Toto bylo pozorováno v obvodovém směru pro 8. cyklus zatěžování a rozdílnost daných dvou skupin byla ještě o trochu markantnější po násobném cyklickém zatěžování při 65. cyklu, viz dodatek, Obrázek 43. V 8. i 65. cyklu zůstalo složení skupin vzorků stejné – vliv násobného cyklického zatěžování nezpůsobil přechod vzorku ze skupiny poddajnějších vzorků do tužších ani naopak. V axiálním směru rozdělení na tyto dvě skupiny nebylo pozorováno, viz Obrázek 34.2 a Obrázek 34.4. Vzorky, které spadají do jednotlivých skupin, jsou rozepsány v dodatku, viz Tabulka 3. Převážná většina nativních vzorků spadá do skupiny s tužší odezvou. Zhruba polovina kryoprezervovaných vzorků patří do skupiny s tužší odezvou, druhá polovina do skupiny poddajnějších vzorků. Při analýze rozměrů kryoprezervovaných vzorků bylo zjištěno, že vzorky s tužší odezvou jsou tepenné štěpy z distálních částí těla, s menším průměrem a s nižší hodnotou poměru středního průměru vůči tloušťce cévní stěny, viz Tabulka 3. Kryoprezervované vzorky z tepen větších průměrů a s vyšší hodnotou zmiňovaného poměru rozměrů – blížily se tedy více modelu válcové skořepiny – spadaly do skupiny s poddajnějšími charakteristikami. Vliv na toto rozdělení kryoprezervovaných vzorků může mít i věk pacientů. Průměrný věk pacientů ze skupiny tužších kryoprezervovaných vzorků byl vyšší (58 let) než průměrný věk pacientů u poddajnější skupiny kryoprezervovaných vzorků (40 let), což koresponduje s teorií korelace nárůstu tuhosti s věkem dle [44].



12 Závěr

V rámci této práce byl zkoumán vliv kryoprezervace na mechanické vlastnosti tepenných štěpů. Kryoprezervované vzorky byly porovnány s mechanickou odezvou skupin nativních vzorků. Současně byl zkoumán vliv rychlosti rozmrazení kryoprezervovaných vzorků na mechanické vlastnosti. Analyzovány a porovnány byly čtyři skupiny vzorků. Dvě skupiny nativních vzorků: štěpy z multiorgánových odběrů – celkem 5 vzorků, štěpy kadaverózní – celkem 9 vzorků. Dále dvě skupiny kryoprezervovaných vzorků rozdělených dle typu rozmrazení: pomalu rozmrazené (dle standardního protokolu TÚ FNHK, tedy po dobu 120 minut) – celkem 8 vzorků, a rychle rozmrazené (po dobu 5 minut) – celkem 10 vzorků. U každého ze vzorků byly určeny základní rozměry – tloušťka cévní stěny a poloměr tepenného štěpu.

Tepenné štěpy byly cyklicky zatěžovány vnitřním tlakem pomocí inflačně-extenzních testů. Každý vzorek byl postupně zatěžován kvazistaticky, poté postupně rychlostí pulzace simulující 30, 60, 120 tepů za minutu, a nakonec opět kvazistaticky. Vzorky byly testovány s nulovým vnějším axiálním předpětím. Celkem bylo provedeno 62 inflačně extenzních testů. V této práci byla vyhodnocena zatěžující fáze 8. a 65. cyklu kvazistatického zatěžování, na kterém bylo možné zkoumat vliv násobného cyklického zatěžování. Celkem bylo vyhodnoceno 372 000 snímků z kamer snímajících změny rozměrů vzorků při inflačně-extenzních testech. Z těchto snímků bylo možné získat data o deformacích v obvodovém a axiálním směru.

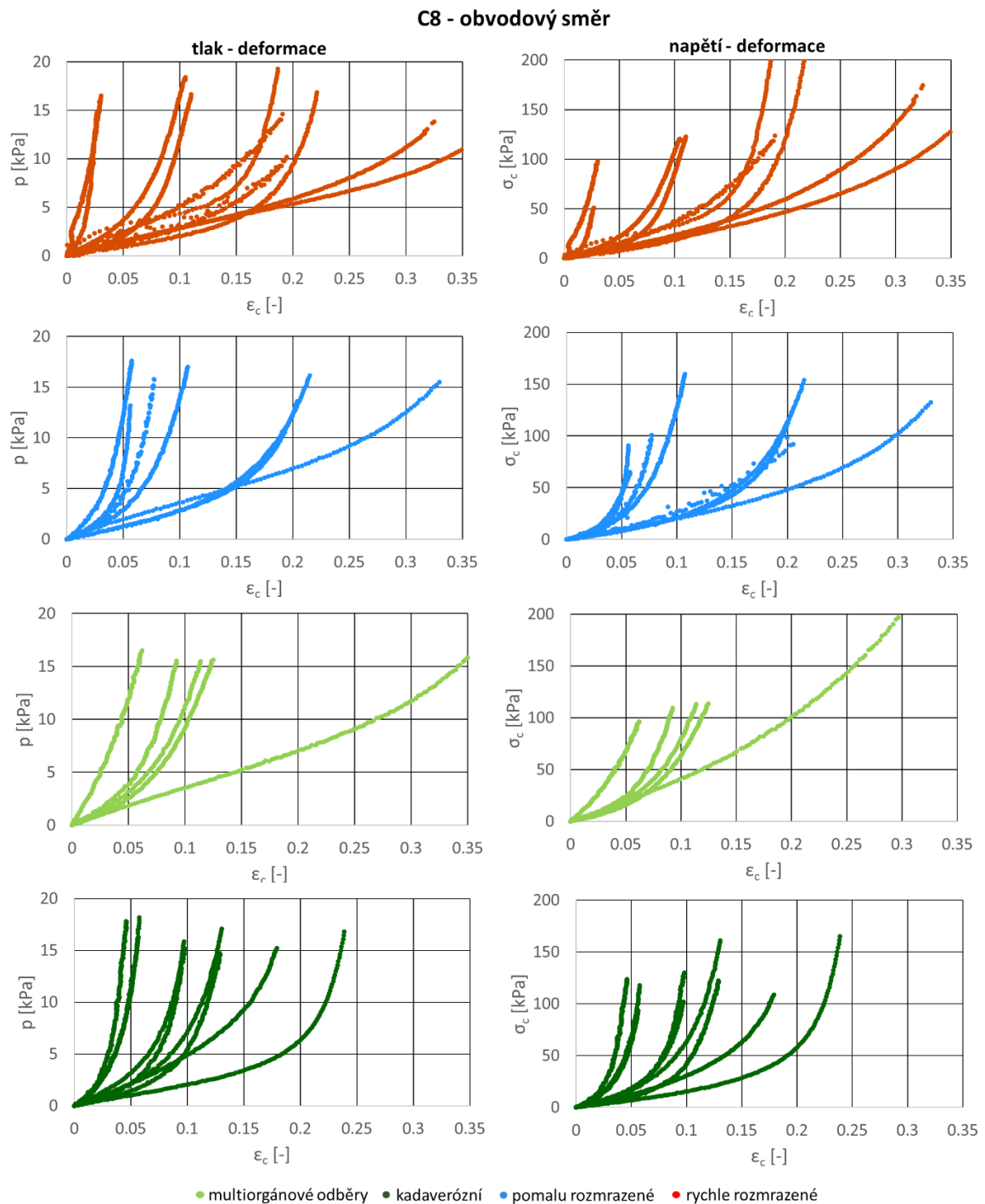
Pro výpočet napětí v obvodovém a axiálním směru byla využita teorie válcových skořepin. Pro jednotlivé skupiny vzorků byly vyneseny reprezentativní průměrné charakteristiky v deformačních směrech. Reprezentativní charakteristiky byly vyneseny do grafů a dle nich byly učiněny tyto závěry práce:

- **Tepenné štěpy všech čtyř skupin se deformují výrazně více v obvodovém směru než v axiálním směru.** Tyto odlišné mechanické vlastnosti ve dvou zkoumaných směrech deformace tak můžeme přisuzovat anizotropii materiálu tepenné stěny.
- **Skupina kadaverózních tepenných štěpů vykazuje při vyšších hodnotách napětí vyšší tuhost než skupina štěpů z multiorgánových odběrů.** Směrnice skupiny kadaverózních štěpů je při vyšším zatížení strmější, kadaverózní štěpy tuhnou rychleji.
- **Skupiny pomalu a rychle rozmrazených vzorků vykazují podobnou odezvu v obvodovém i axiálním směru přibližně do hodnoty diastolického tlaku.** Nad hodnotou diastolického tlaku se reprezentativní křivky od sebe odchyľují, rychle rozmrazené se deformují více, jsou poddajnější.

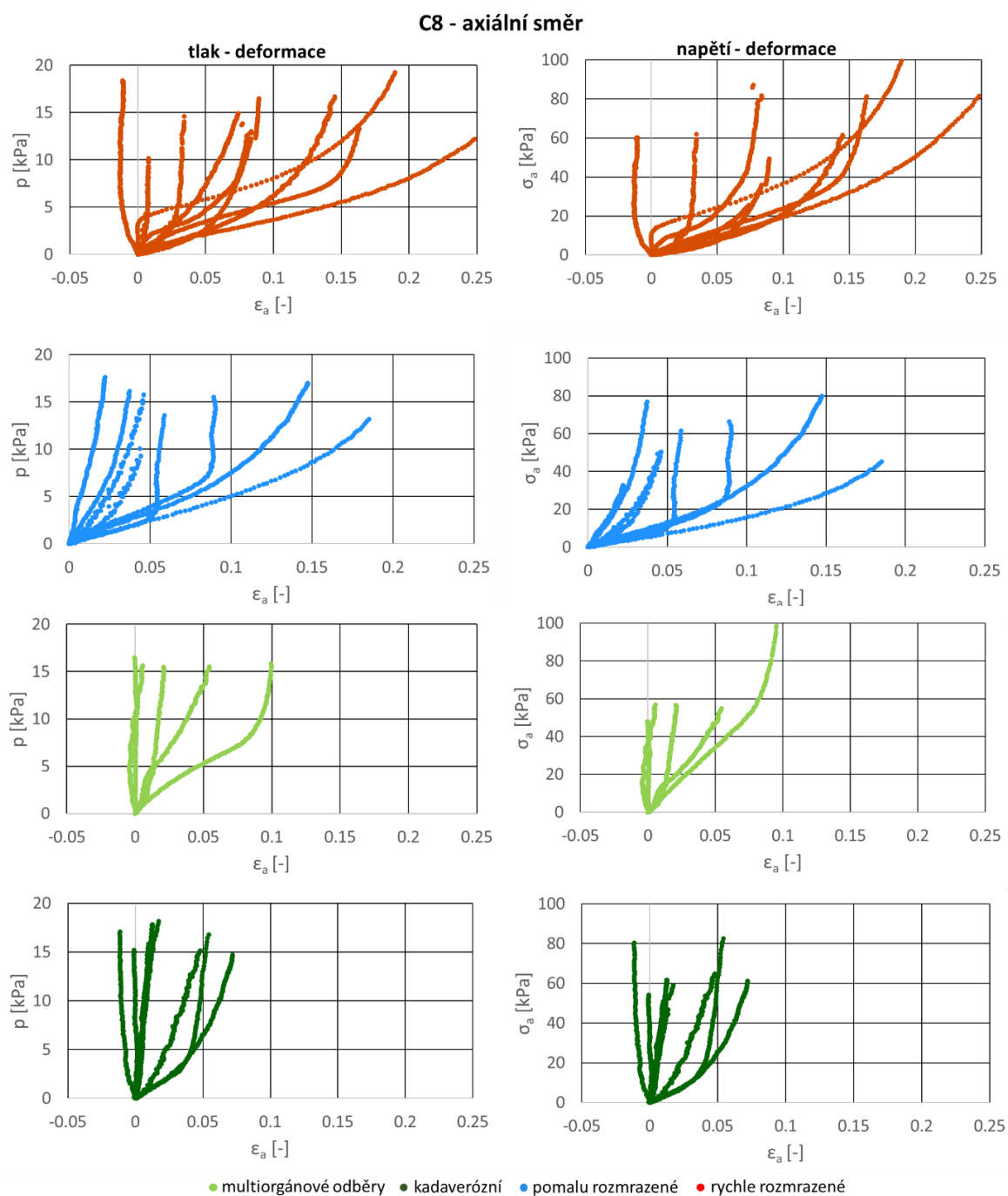
- **Vliv násobného cyklického zatěžování je patrný v nárůstu poddajnosti u všech skupin vzorků, především pak u těch kryoprezervovaných.** Při porovnání 8. a 65. cyklu při kvazistatickém zatěžování je především u skupin kryoprezervovaných vzorků patrný nárůst deformace při 65. cyklu, výrazněji pak u skupiny rychle rozmrazených vzorků.
- **Kryoprezervace zvyšuje poddajnost a snižuje míru anizotropie.** V obvodovém směru skupin kryoprezervovaných vzorků lze pozorovat výrazně vyšší deformace oproti skupinám nativních vzorků. Výrazný nárůst deformace je tak patrný hlavně v axiálním směru u skupin kryoprezervovaných vzorků. Charakteristiky v axiálním a obvodovém směru u skupin kryoprezervovaných vzorků vykazují navzájem velmi podobné trendy. Tím se liší od skupin nativních vzorků, kde je patrná větší míra anizotropie, tedy že v jednotlivých směrech deformace se mechanické odezvy ztelně liší. Charakteristiky v axiálním směru se u skupin kryoprezervovaných vzorků dokonce velmi blíží charakteristikám v obvodovém směru skupin nativních vzorků.
- **Pomalou rozmrazené štěpy vykazují podobnou mechanickou odezvu nad hodnotou diastolického tlaku jako štěpy z multiorgánových odběrů.** Křivky zatížení v obvodovém i axiálním směru mají nad hodnotou diastolického tlaku podobné směrnice. Pomalu rozmrazené vzorky se pouze při nižších hodnotách napětí deformují více, při vyšším napětí se však deformují podobně jako štěpy z multiorgánových odběrů. **Standardní protokol rozmrazení (pomalý – 120 minut při 2–8 °C) se tak jeví jako vhodnější metoda rozmrazení kryoprezervovaných vzorků.**

V této práci bylo zkoumáno poměrně velké množství vzorků tepenných štěpů. Přesto by bylo vhodné provést další testování pro potvrzení závěrů této práce. Především by pak měl být brán zřetel na rozměrovou a anatomickou podobnost zkoumaných štěpů. Jak bylo zmíněno, v této práci byly porovnávány tepenné štěpy rozdílných anatomických typů. Pro přesnější analýzu mechanických vlastností tepenných štěpů jako biologického materiálu by bylo vhodnější použít matematické modely pro anizotropní hyperelastický materiál, jak je užito v práci [2]. Pro věrnější simulaci in vivo podmínek by bylo vhodné provést testování s vnějším axiálním předpětím. V dalším výzkumu by bylo vhodné spojit analýzu mechanických vlastností pomocí inflačně-extenzních testů s analýzou morfologických a histologických změn kryoprezervovaných vzorků pomocí elektronového mikroskopu. Detailnější zkoumání korelace mezi změnou struktury a změnou mechanických vlastností by jistě byla zajímavým přínosem do problematiky kryoprezervace cév.

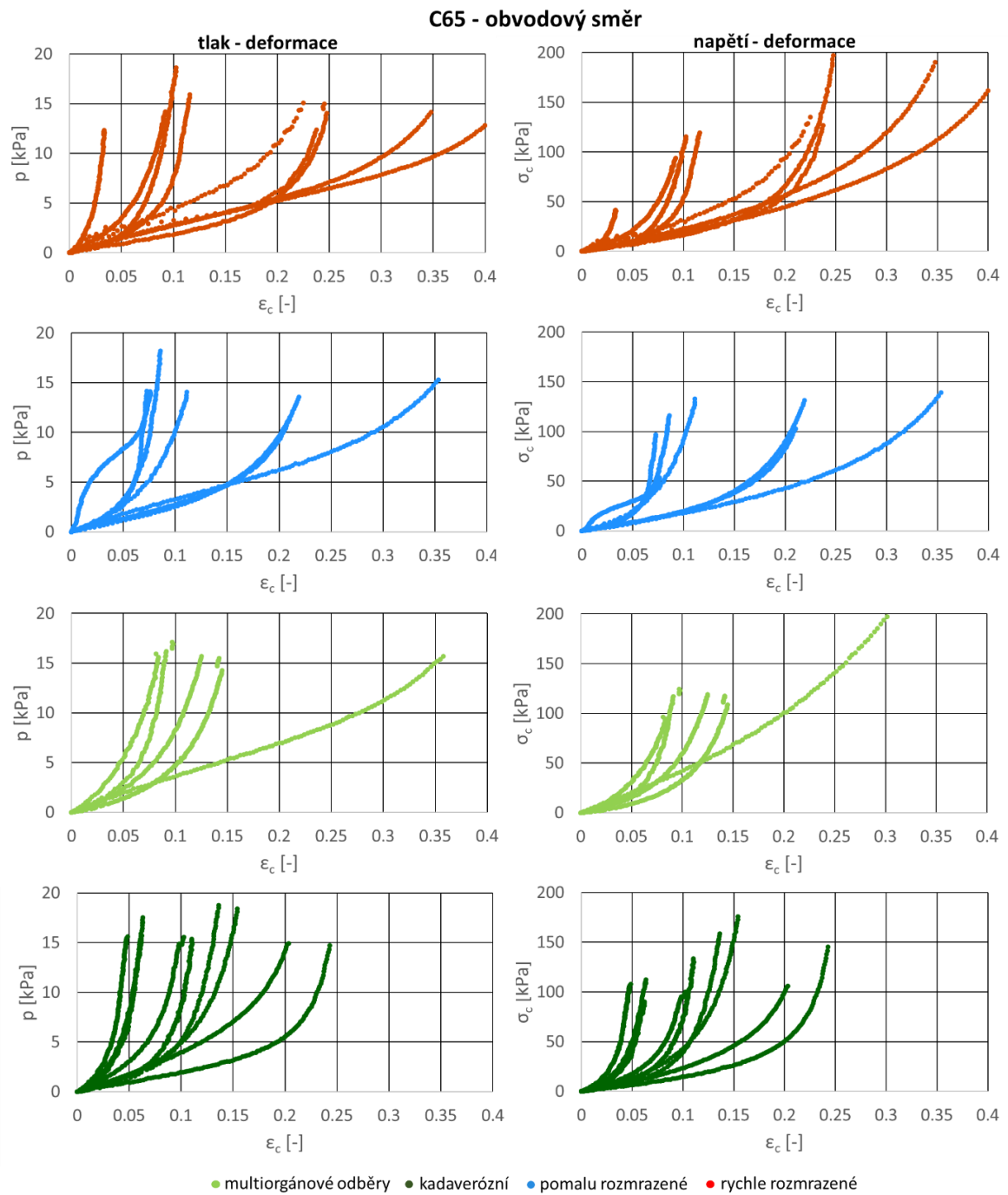
13 Dodatek



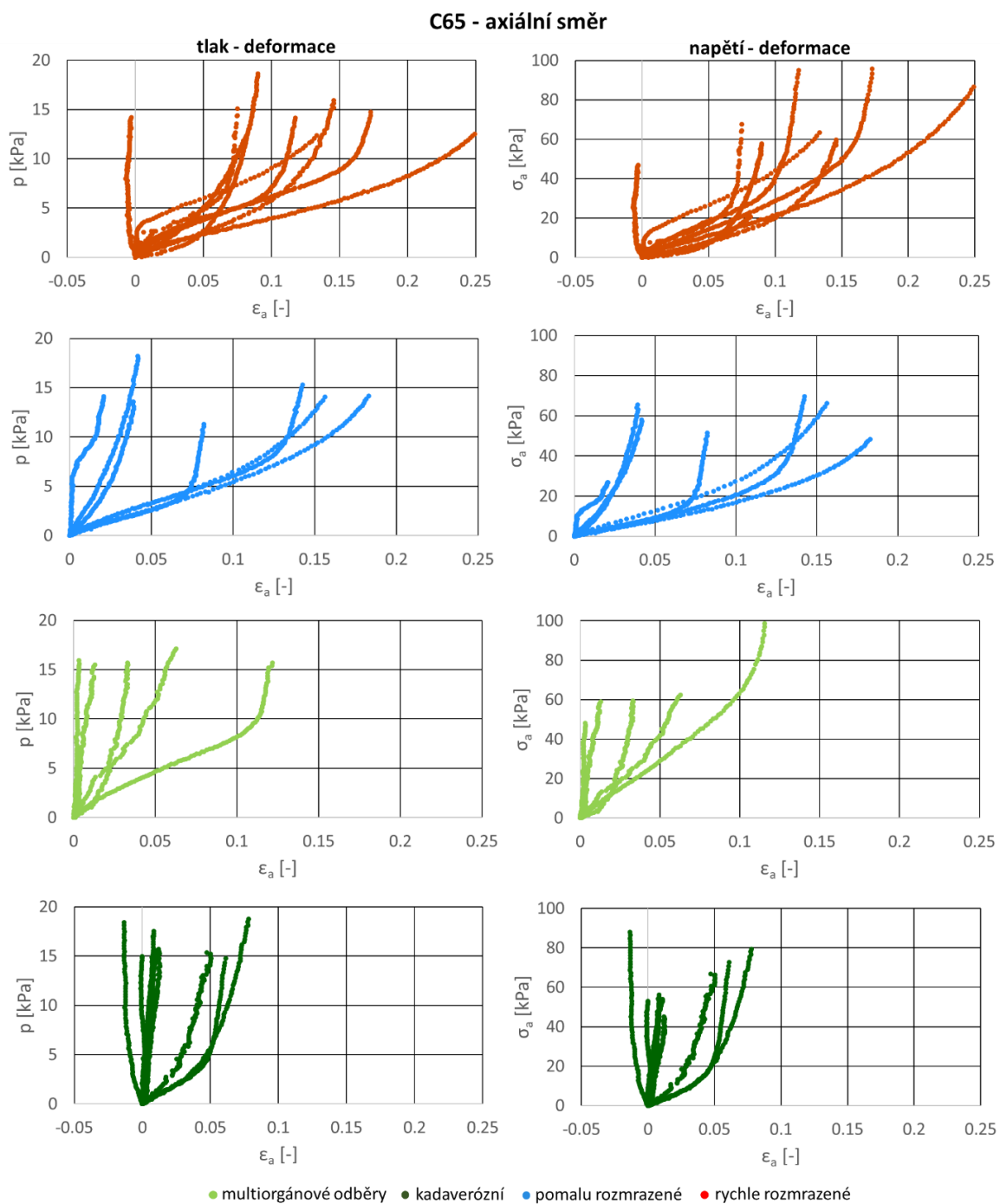
Obrázek 39 – Přehled charakteristik jednotlivých skupin vzorků v obvodovém směru pro 8. zatěžovací cyklus; vlevo závislost tlak-deformace, vpravo napětí-deformace



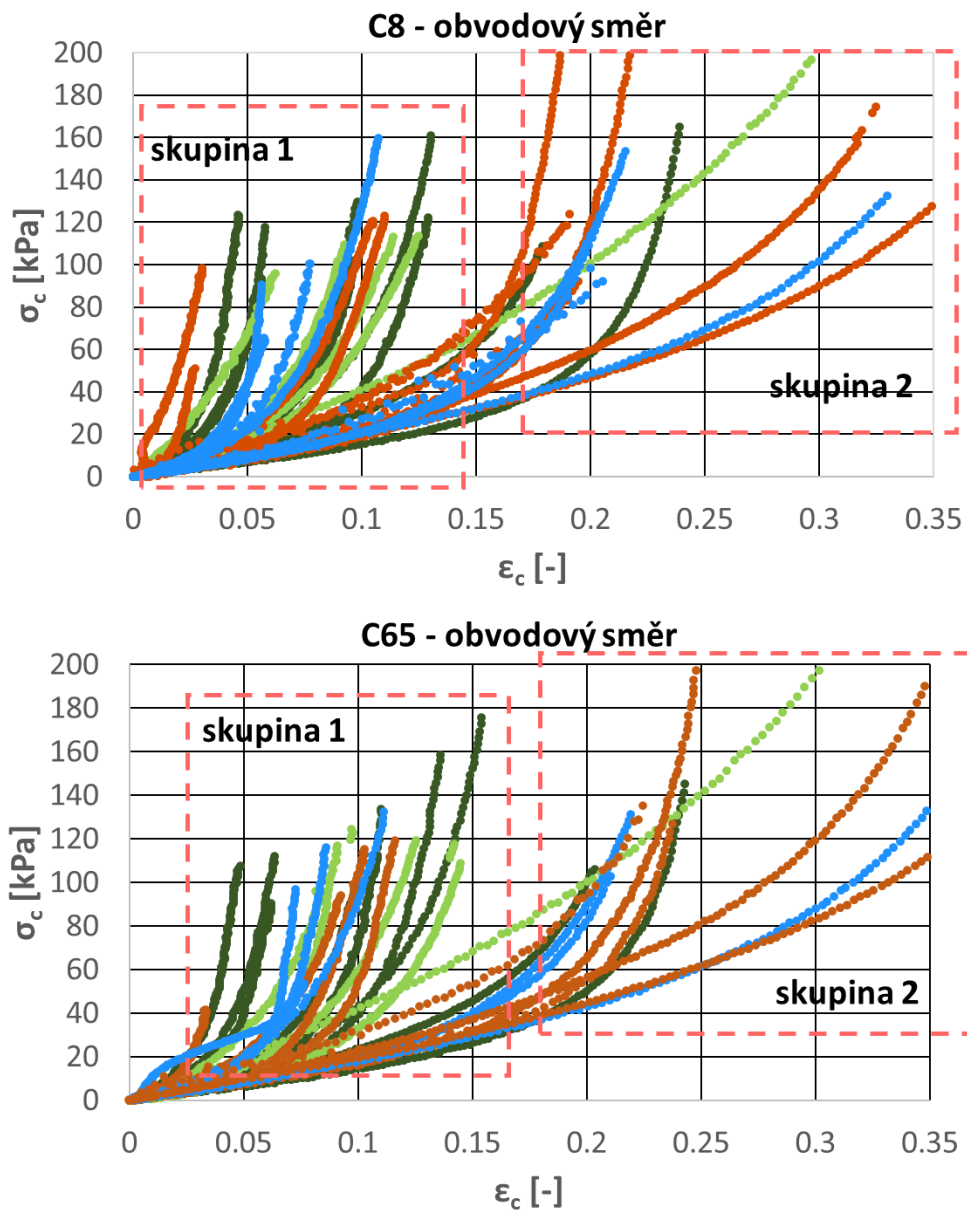
Obrázek 40 – Přehled charakteristik jednotlivých skupin vzorků v axiálním směru pro 8. zatěžovací cyklus; vlevo závislost tlak-deformace, vpravo napětí-deformace



Obrázek 41 – Přehled charakteristik jednotlivých skupin vzorků v obvodovém směru pro 65. zatěžovací cyklus; vlevo závislost tlak-deformace, vpravo napětí-deformace



Obrázek 42 – Přehled charakteristik jednotlivých skupin vzorků v axiálním směru pro 65. zatěžovací cyklus; vlevo závislost tlak-deformace, vpravo napětí-deformace



Obrázek 43 – Vyznačení dvou skupin se zřetelně rozdílnou mechanickou odezvou v obvodovém směru při 8. a 65. zatěžovacím cyklu; skupina 1 – vzorky s tužší odezvou; skupina 2 – vzorky s poddajnější odezvou

Skupina 1 - obvodový směr - tužší vzorky					
Označení vzorku ČVUT	Typ štěpu anatomicky	Pohlaví, věk	Rozměry		Poměr Dm/H
			Tloušťka stěny	Střední poloměr	
			H [mm]	Rm [mm]	
14RD	bifurkace aorty, ilické tepny	muž, 40 let	0.671	3.134	9.340
13RD	bifurkace aorty, ilické tepny	muž, 40 let	0.636	3.436	10.805
10RD	a.femoralis	muž, 61 let	1.153	3.423	5.937
19RD	bifurkace aorty, ilické tepny	žena, 73 let	0.740	3.062	8.276
12PD	bifurkace aorty	muž, 27 let	0.432	2.619	12.123
18PD	bifurkace aorty, ilické tepny	muž, 72 let	0.864	4.731	10.951
17PD	a.femoralis	muž, 67 let	0.803	3.925	9.776
16PD	a.femoralis	muž, 61 let	1.034	2.915	5.638
29D	ilické tepny	muž, 53 let	0.947	4.880	10.306
30D	ilické tepny	muž, 53 let	0.773	3.355	8.680
32D	a.femoralis superf.	žena, 44 let	0.527	2.308	8.759
33D	a.femoralis superf.	žena, 44 let	0.569	2.151	7.560
37D	ilické tepny	muž, 46 let	0.610	3.657	11.991
38D	ilické tepny	muž, 46 let	0.682	3.861	11.322
43D	ilické tepny	muž, 76 let	0.738	5.000	13.551
44D	ilické tepny	muž, 76 let	0.799	4.861	12.167
46D	ilické tepny	muž, 76 let	0.488	3.452	14.147
47D	břišní aorta	muž, 70 let	0.982	5.777	11.767
50D	karotida	muž, 79 let	0.777	4.457	11.472
Průměr					10.240
Skupina 2 - obvodový směr - poddajnější vzorky					
Označení vzorku ČVUT	Typ štěpu anatomicky	Pohlaví, věk	Rozměry		Poměr Dm/H
			Tloušťka stěny	Střední poloměr	
			H [mm]	Rm [mm]	
9RD	a.femoralis	žena, 36 let	0.483	2.687	11.128
1RD	oblouk aorty a hrudní aorta	muž, 27 let	1.339	7.211	10.771
20RD	bifurkace aorty	muž, 21 let	0.523	3.484	13.323
2RD	oblouk a hrudní aorta	muž, 27 let	1.583	10.152	12.826
5RD	oblouk a hrudní aorta	muž, 38 let	1.255	9.150	14.581
6RD	hrudní aorta	muž, 41 let	1.399	8.051	11.510
15PD	oblouk a hrudní aorta	muž, 65 let	1.657	10.152	12.254
4PD	oblouk aorty	muž, 49 let	1.395	8.891	12.748
11PD	bifurkace aorty	muž, 27 let	0.721	4.609	12.785
8PD	hrudní aorta	muž, 37 let	1.919	8.672	9.038
31D	hrudní aorta	žena, 44 let	0.910	8.137	17.884
39D	břišní aorta	muž, 46 let	1.191	7.273	12.212
49D	karotida	muž, 70 let	0.827	4.163	10.068
Průměr					12.394

Tabulka 3 – Přehled vzorků v jednotlivých skupinách z Obrázek 43 s detailnějším popisem a vyznačením poměru Dm/H a průměru tohoto poměru u jednotlivých skupin (žlutě)



14 Seznam obrázků

Obrázek 1 – Znázornění procesu balónkové angioplastiky s aplikací stentu [4]	14
Obrázek 2 – Metoda bypassu; A – schematické znázornění přemostění postižené oblasti; B – napojení cévní náhrady end-to-side; C – napojení cévní náhrady end-to-end [6].....	15
Obrázek 3 – Porovnání pravděpodobnosti přežití a výskytu neprůchodnosti cévních náhrad – kryoprezervované tepenné alotransplantáty a umělé cévní náhrady z materiálu Dacron [8], upraveno.....	16
Obrázek 4 – Průběh tlaku během srdečního cyklu v aortě a v srdeční komoře, vyznačen je též diakrotický zářez následující po systole [9], upraveno	17
Obrázek 5 – Průběh tlaku v závislosti na typu a velikosti cév [22]	18
Obrázek 6 – Přehled typů cév, jejich rozměrů a základního složení [13], upraveno	19
Obrázek 7 – Struktura molekul proteinu kolagenu (A) a elastinu (B), zde viditelné uspořádání kolagenních vláken do trojitě šroubovicovité struktury a mechanická odezva elastinových vláken (natažení a opětovné zvlnění) na úrovni elastinových molekul, které jsou mezi sebou spojeny kovalentními vazbami [14], upraveno.....	19
Obrázek 8 – Schématické znázornění základní struktury tepen a žil [24].....	21
Obrázek 9 – Porovnání stavby cévní stěny tepny a žíly v histologickém řezu; a. thoracica interna (A, B); v. saphena (C, D); 1 – endothelium; 2 – elastica lamina interna; 3 – tunica intima; 4 – tunica media; 5 – tunica adventitia, [18].....	21
Obrázek 10 – Zatěžovací charakteristika tepenné stěny s vizualizací napínání vláken kolagenu a elastinu [17], upraveno.....	22
Obrázek 11 – Samovolné rozevření kroužku tepenného štěpu do úhlu rozevření alfa jako demonstrace vnitřního předpětí v obvodovém směru.....	23
Obrázek 12 – Zvětšování vnitřního poloměru karotid v závislosti na věku (vlevo), snižování axiálního předpětí karotid v závislosti na věku [20]	23
Obrázek 13 - Zatěžovací charakteristiky a) lineární elastický materiál s konstantním modulem pružnosti E; b) nelineární elastický materiál a proměnným modulem pružnosti; c) viskoelastický materiál s viditelnou oblastí hystereze; d) zobrazení vlivu zvyšující se rychlosti deformace (tuhnutí); e) creep materiálu; f) relaxace materiálu [25], upraveno....	24
Obrázek 15 – Zatěžovací charakteristiky VSM pro různé rychlosti zatěžování při inflačně-extenzních testech pro axiální (□) a obvodový (○) směr; frekvence zatěžování: modrá – 0,04 Hz; červená – 0,5 Hz; zelená – 1 Hz [26].....	25
Obrázek 14 – Viditelné ustalování mechanické odezvy viskoelastického materiálu – v tomto případě t. intima věnčité tepny při cyklických uniaxiálních testech kvazistatickou rychlostí zatěžování [27], upraveno.....	25
Obrázek 16 – Schématický proces kryoprezervace buňky – vliv rychlosti zrazování a poškození buňky; A – pomalé zmrazování a dehydratace buňky vlivem osmotické nerovnováhy; B – optimální rychlost zmrazování; C – rychlé zmrazování a tvorba krystalů	

Seznam tabulek/Literatura

ledu přímo v cytoplazmě buňky; CPA – kryoprotektanty (cryoprotective agents) [28], upraveno	27
Obrázek 17 – Nejčastěji kryoprezervované cévy a jejich části v ČR; A – bifurkace aorty s ilickými a femorálními tepnami; B – tepny dolní končetiny od bifurkace aorty až po popliteální tepny; C – VSM v plné délce [34]	29
Obrázek 18 – Znázornění vytnutí vzorků pro testování; A – část tepenného štěpu určená pro inflačně-extenzní testy; B – čtvercový vzorek pro dvouosou tahovou zkoušku; C a D – obdélníkový vzorek pro jednoosou tahovou zkoušku v axiálním (C) a obvodovém směru (D); E – vytnutý kroužek pro jednoosou tahovou zkoušku v obvodovém směru; B1 a B2 je čtvercový a křížový tvar vzorku pro dvouosou tahovou zkoušku; C1 a D1 je obdélníkový tvar a C2 a D2 je tzv. dumb-bell tvar vzorku pro jednoosou tahovou zkoušku [36], upraveno	30
Obrázek 19 – Schematické znázornění jednoosé tahové zkoušky; A a B – standardní jednoosá tahová zkouška obdélníkového vzorku cévní stěny v referenční poloze a poloze při zatížení; C a D – jednoosá tahová zkouška prstence cévy v referenční poloze a poloze při zatížení; r_w – poloměr drátku přenášejícího zatížení [35], upraveno	31
Obrázek 20 – Schematické znázornění dvouosé rovinné tahové zkoušky, viditelně na sebe kolmé směry namáhání čtvercového vzorku, v centrální oblasti červeně vyznačené značky pro vyhodnocení posunů digitální korelací obrazu; A – bez zatížení; B – se zatížením [35], upraveno	32
Obrázek 21 – Snímání průběhu deformování tepenného štěpu při inflačně-extenzním testu; A – bez zatížení; B – se zatížením	33
Obrázek 22 – Princip inflačně-extenzních testů, znázornění změn základních rozměrů při zatížení štěpu vnitřním tlakem, nahoře pevný a dole pohyblivý upínací trn, vyznačena oblast ROI [35], upraveno	33
Obrázek 23 – Schéma bublinového inflačního testu, šedé body znázorňují značky pro vyhodnocení deformací digitální korelací obrazu [36]	34
Obrázek 24 – Vytnutí nekonečně malého elementu mezi dvě meridiány a dvěma rovnoběžkami (A) a znázornění na sebe kolmých napětí způsobených vnitřním tlakem ve směru meridiánů a rovnoběžek (B) [38]	36
Obrázek 25 – Vyňatý element skořepiny s vyznačenými silovými účinky [38], upraveno	37
Obrázek 26 – Znázornění namáhání a silových účinků na cévní stěnu při inflačně-extenzních testech, ze kterého vychází výpočty napětí v jednotlivých směrech	38
Obrázek 27 – Nativní vzorek ilické tepny s odříznutými kroužky pro měření tloušťky stěny a průměru vzorku	40
Obrázek 28 – Porovnání rozměrů jednotlivých skupin zkoumaných tepenných štěpů, vlevo vnitřní poloměr R_i , vpravo tloušťka stěny H	41
Obrázek 29 – Schéma aparatury inflačně-extenzních testů; 1 – tepenný štěp; 2 – spodní pohyblivý upínací trn; 3 – horní pevný upínací trn; 4 – stojan; 5 – tlakový senzor; 6 – vysokofrekvenční kamery; 7 – pulsátor; 8 – analogově-digitální převodník; 9 – měřicí a	



řídící počítač tlak. senzoru a pulsátoru; 10 – Měřicí počítač kamer. systému; 11 – synchronizační tlačítko	42
Obrázek 30 – Detail testovací aparatury inflačně-extenzního testu; 1 – testovaný tepenný štěp s nalepenými značkami v horizontálním směru; 2 – tlakový senzor; 3 – horní nepohyblivý upínací trn; 4 – spodní pohyblivý upínací trn.....	43
Obrázek 31 – Ukázka detekování hran v ROI a převedení snímků na binární mapu v prostředí Matlab.....	43
Obrázek 32 – Průběh tlaku a vyznačení 8. a 65. cyklu, vlevo znázornění posloupnosti zatěžovacích rychlostí.....	44
Obrázek 33 – Zatěžovací křivky tlak-deformace všech vzorků všech skupin pro 8. cyklus (C8 – 1 a 2) a 65. cyklus (C65 – 3 a 4) v obvodovém a axiálním směru	46
Obrázek 34 – Zatěžovací křivky napětí-deformace všech vzorků všech skupin pro 8. cyklus (C8 – 1 a 2) a 65. cyklus (C65 – 3 a 4) v obvodovém a axiálním směru.....	47
Obrázek 35 – Znázornění získání reprezentativní průměrné charakteristiky pomocí interpolace experimentálních dat, v tomto případě v obvodovém směru kadaverózních nativních vzorků	48
Obrázek 36 - Reprezentativní průměrné charakteristiky získané pomocí interpolace pro 8. cyklus kvazistatického zatěžování – skupiny nativních vzorků (1) a skupiny kryoprezervovaných vzorků (2); pro 65. zatěžovací cyklus – skupiny nativních vzorků (3) a skupiny kryoprezervovaných vzorků (4); kde (a) – axiální směr; (c) – obvodový směr..	50
Obrázek 37 – Porovnání reprezentativních charakteristik kryoprezervovaných skupin vzorků pro 8. a 65. cyklus (1 a 2) při kvazistatickém zatěžování, vyznačena hodnota napětí odpovídající diastolickému tlaku (diastola), na které se charakteristiky rychle a pomalu rozmrazené skupiny začínají odchylovat od sebe, (a) – axiální směr; (c) – obvodový směr	51
Obrázek 38 – Podobnost trendů charakteristik skupin vzorků z multiorgánových odběrů a vzorků pomalu rozmrazených nad hodnotou diastolického tlaku pro 8. cyklus (1) a 65. cyklus (2) kvazistatického zatěžování, (a) – axiální směr; (c) – obvodový směr.....	52
Obrázek 39 – Přehled charakteristik jednotlivých skupin vzorků v obvodovém směru pro 8. zatěžovací cyklus; vlevo závislost tlak-deformace, vpravo napětí-deformace	59
Obrázek 40 – Přehled charakteristik jednotlivých skupin vzorků v axiálním směru pro 8. zatěžovací cyklus; vlevo závislost tlak-deformace, vpravo napětí-deformace	60
Obrázek 41 – Přehled charakteristik jednotlivých skupin vzorků v obvodovém směru pro 65. zatěžovací cyklus; vlevo závislost tlak-deformace, vpravo napětí-deformace	61
Obrázek 42 – Přehled charakteristik jednotlivých skupin vzorků v axiálním směru pro 65. zatěžovací cyklus; vlevo závislost tlak-deformace, vpravo napětí-deformace	62
Obrázek 43 – Vyznačení dvou skupin se zdatelně rozdílnou mechanickou odezvou v obvodovém směru při 8. a 65. zatěžovacím cyklu; skupina 1 – vzorky s tužší odezvou; skupina 2 – vzorky s poddajnější odezvou	63

15 Seznam tabulek

Tabulka 1 – Vzorok tepenných štěpů se zařazením do skupin, označením, anatomickou specifikací a základními rozměry a středními hodnotami základních rozměrů	40
Tabulka 2 – Výsledky oboustranných dvojbých t-testů s nerovností rozptylů mezi zkoumanými skupinami vzorků; žádná porovnávaná skupina se signifikantně neliší při hladině významnosti $p = 0,05$	41
Tabulka 3 – Přehled vzorků v jednotlivých skupinách z Obrázku 43 s detailnějším popisem a vyznačením poměru Dm/H a průměru tohoto poměru u jednotlivých skupin (žlutě).....	64



16 Literatura

- [1] GAZIANO, Thomas A., Asaf BITTON, Shuchi ANAND, Shafika ABRAHAMSGESSEL a Adrianna MURPHY. Growing Epidemic of Coronary Heart Disease in Low- and Middle-Income Countries. *Current Problems in Cardiology* [online]. 2010, **35**(2), 72–115. ISSN 01462806. Dostupné z: doi:10.1016/j.cpcardiol.2009.10.002
- [2] SOBOTKA, Zbyněk. *Mechanická odezva kryoprezervovaných žil zatěžovaných dynamicky vnitřním tlakem*. Praha, 2021. Diplomová práce. České vysoké učení technické v Praze, Fakulta strojní.
- [3] CHLUPÁČ, J, E FILOVÁ a L BAČÁKOVÁ. Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. *Physiological Research* [online]. 2009, S119–S140. ISSN 1802-9973, 0862-8408. Dostupné z: doi:10.33549/physiolres.931918
- [4] Coronary Angioplasty Stent Procedure. *Dr. Raghu Cardiologist* [online]. Dostupné z: <https://drraghu.com/services/coronary-angioplasty-stents>
- [5] KNIGHT, Darryl K., Elizabeth R. GILLIES a Kibret MEQUANINT. Vascular Grafting Strategies in Coronary Intervention. *Frontiers in Materials* [online]. 2014, **1** [vid. 2022-06-05]. ISSN 2296-8016. Dostupné z: doi:10.3389/fmats.2014.00004
- [6] Vascular Anastomosis. *mSurgery* [online]. Dostupné z: <https://msurgery.ie/home/operative-procedures/major-procedures/vascular-surgery/vascular-anastomosis/>
- [7] VOGT, Paul R., Hans-Peter Brunner-La ROCCA, Thierry CARREL, Ludwig K. von SEGESSER, Christian RUEF, Jörg DEBATIN, Burkhardt SEIFERT, Wolfgang KIOWSKI a Marko I. TURINA. Cryopreserved arterial allografts in the treatment of major vascular infection: A comparison with conventional surgical techniques. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* [online]. 1998, **116**(6), 965–972. ISSN 0022-5223. Dostupné z: doi:[https://doi.org/10.1016/S0022-5223\(98\)70048-0](https://doi.org/10.1016/S0022-5223(98)70048-0)
- [8] BISDAS, Theodosios, Mathias WILHELMI, Axel HAVERICH a Omke E. TEEBKEN. Cryopreserved arterial homografts vs silver-coated Dacron grafts for abdominal aortic infections with intraoperative evidence of microorganisms. *Journal of Vascular Surgery* [online]. 2011, **53**(5), 1274-1281.e4. ISSN 07415214. Dostupné z: doi:10.1016/j.jvs.2010.11.052
- [9] Cardiac cycle pressure only.png. *Wikipedia Commons* [online]. 31. květen 2009. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cardiac_cycle_pressure_only.png
- [10] RHODIN, Johannes A. G. Architecture of the Vessel Wall. In: Ronald TERJUNG, ed. *Comprehensive Physiology* [online]. 1. vyd. B.m.: Wiley, 1980 [vid. 2022-05-10], s. 1–31. ISBN 978-0-470-65071-4. Dostupné z: doi:10.1002/cphy.cp020201

Literatura

- [11] GAO, Yuansheng. *Biology of vascular smooth muscle: vasoconstriction and dilatation*. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2017. ISBN 978-981-10-4809-8.
- [12] OLIVER, M. Francis, Stanley W. JACOB a Mark L. ENTMAN. *Human cardiovascular system* [online]. 2020.
Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/human-cardiovascular-system>.
- [13] The human circulatory system. Anatomy of blood vessels. Diagram of the diameter and structure of aorta, arteries, arterioles, capillaries, venules, and veins. Vector illustration in a flat style. *Adobestock.com* [online]. [vid. 2022-05-07].
Dostupné z: https://stock.adobe.com/cz/images/the-human-circulatory-system-anatomy-of-blood-vessels-diagram-of-the-diameter-and-structure-of-aorta-arteries-arterioles-capillaries-venules-and-veins-vector-illustration-in-a-flat-style/295715497?prev_url=detail
- [14] ALBERTS, Bruce. *Essential cell biology*. Fourth edition. New York, NY: Garland Science, 2013. ISBN 978-0-8153-4454-4.
- [15] MARTINEZ-LEMUS, Luis A. The Dynamic Structure of Arterioles: ANATOMY OF RESISTANCE ARTERIES. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* [online]. 2012, **110**(1), 5–11. ISSN 17427835.
Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-7843.2011.00813.x
- [16] BETTS, J. Gordon, Peter DESAIX, Eddie JOHNSON Johnson, Jody E, Oksana KOROL, Dean KRUSE, Brandon POE, James WISE, Mark D WOMBLE, Kelly A YOUNG, OPENSTAX COLLEGE, OPEN TEXTBOOK LIBRARY, a OPENSTAX (NONPROFIT ORGANIZATION). *Anatomy & physiology* [online]. 2013 [vid. 2022-05-23]. ISBN 978-1-947172-04-3.
Dostupné z: <https://openstax.org/details/anatomy-and-physiology>
- [17] SINGH, Charanpreet, Cynthia WONG a Xungai WANG. Medical Textiles as Vascular Implants and Their Success to Mimic Natural Arteries. *Journal of Functional Biomaterials* [online]. 2015, **6**(3), 500–525. ISSN 2079-4983.
Dostupné z: doi:10.3390/jfb6030500
- [18] NAWROCKI, Mariusz J., Bartłomiej PEREK, Patrycja SUJKA-KORDOWSKA, Aneta KONWERSKA, Sandra KAŁUŻNA, Piotr ZAWIERUCHA, Małgorzata BRUSKA, Maciej ZABEL, Marek JEMIELITY, Michał NOWICKI, Bartosz KEMPISTY a Agnieszka MALIŃSKA. Differences in Expression of Genes Involved in Bone Development and Morphogenesis in the Walls of Internal Thoracic Artery and Saphenous Vein Conduits May Provide Markers Useful for Evaluation Graft Patency. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, **20**(19), 4890. ISSN 1422-0067.
Dostupné z: doi:10.3390/ijms20194890
- [19] PIERRE, Badel, Avril STÉPHANE, Lessner SUSAN a Sutton MICHAEL. Mechanical identification of hyperelastic anisotropic properties of mouse carotid arteries. In: Tom PROULX, ed. *Mechanics of Biological Systems and Materials, Volume 2* [online]. New York, NY: Springer New York, 2011 [vid. 2022-05-10], Conference Proceedings of the Society for Experimental Mechanics Series, s. 11–



17. ISBN 978-1-4614-0218-3.
Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4614-0219-0_2
- [20] HORNÝ, Lukáš, Tomáš ADÁMEK a Markéta KULVAJTOVÁ. A comparison of age-related changes in axial prestretch in human carotid arteries and in human abdominal aorta. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* [online]. 2017, **16**(1), 375–383. ISSN 1617-7959, 1617-7940.
Dostupné z: doi:10.1007/s10237-016-0797-y
- [21] ZHANG, Wei, Yi LIU a Ghassan S. KASSAB. Viscoelasticity reduces the dynamic stresses and strains in the vessel wall: implications for vessel fatigue. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* [online]. 2007, **293**(4), H2355–H2360. ISSN 0363-6135, 1522-1539.
Dostupné z: doi:10.1152/ajpheart.00423.2007
- [22] Krevní oběh. *Funkce buněk a lidského těla* [online]. [vid. 2022-05-07].
Dostupné z: <http://www.fblt.cz/skripta/x-srdce-a-obeh-krve/2-krevni-obeh/>.
- [23] The human circulatory system. Anatomy of blood vessels. Diagram of the diameter and structure of aorta, arteries, arterioles, capillaries, venules, and veins. Vector illustration in a flat style. *Adobestock.com* [online].
Dostupné z: https://stock.adobe.com/cz/images/the-human-circulatory-system-anatomy-of-blood-vessels-diagram-of-the-diameter-and-structure-of-aorta-arteries-arterioles-capillaries-venules-and-veins-vector-illustration-in-a-flat-style/295715497?prev_url=detail
- [24] Artery vs Vein. *Springernature* [online]. [vid. 2022-05-06].
Dostupné z: https://media.springernature.com/original/springer-static/image/chp%3A10.1007%2F978-3-319-71530-8_13-1/MediaObjects/459237_0_En_13-1_Fig1_HTML.png
- [25] WANG, Zhijie, Mark J. GOLOB a Naomi C. CHESLER. Viscoelastic Properties of Cardiovascular Tissues. In: Mohamed Fathy EL-AMIN, ed. *Viscoelastic and Viscoplastic Materials* [online]. B.m.: InTech, 2016 [vid. 2022-05-10]. ISBN 978-953-51-2602-7.
Dostupné z: doi:10.5772/64169
- [26] VESELÝ, J., L. HORNÝ, H. CHLUP a R. ŽITNÝ. Inflation Tests of Vena Saphena Mangna for Different Loading Rates. In: Laura M. ROA ROMERO, ed. *XIII Mediterranean Conference on Medical and Biological Engineering and Computing 2013* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2014 [vid. 2022-05-10], IFMBE Proceedings, s. 1041–1044. ISBN 978-3-319-00845-5.
Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-00846-2_258
- [27] HOLZAPFEL, Gerhard A., Gerhard SOMMER, Christian T. GASSER a Peter REGITNIG. Determination of layer-specific mechanical properties of human coronary arteries with nonatherosclerotic intimal thickening and related constitutive modeling. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* [online]. 2005, **289**(5), H2048–H2058. ISSN 0363-6135, 1522-1539.
Dostupné z: doi:10.1152/ajpheart.00934.2004

Literatura

- [28] JANG, Tae Hoon, Sung Choel PARK, Ji Hyun YANG, Jung Yoon KIM, Jae Hong SEOK, Ui Seo PARK, Chang Won CHOI, Sung Ryul LEE a Jin HAN. Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative Medicine Research* [online]. 2017, **6**(1), 12–18. ISSN 22134220.
Dostupné z: doi:10.1016/j.imr.2016.12.001
- [29] HUBEL, Allison a Amy P. N. SKUBITZ. Principles of Cryopreservation. In: Pierre HAINAUT, Jim VAUGHT, Kurt ZATLOUKAL a Markus PASTERK, ed. *Biobanking of Human Biospecimens* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017 [vid. 2022-06-04], s. 1–21. ISBN 978-3-319-55118-0.
Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-55120-3_1
- [30] MOO-YOUNG, Murray. *Comprehensive biotechnology* [online]. 2019 [vid. 2022-06-04]. ISBN 978-0-444-64047-5.
Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/referenceworks/9780444640475>
- [31] GAO, D. a J. K. CRITSER. Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells. *ILAR Journal* [online]. 2000, **41**(4), 187–196. ISSN 1084-2020.
Dostupné z: doi:10.1093/ilar.41.4.187
- [32] MÜLLER-SCHWEINITZER, Else. Cryopreservation of vascular tissues. *Organogenesis* [online]. 2009, **5**(3), 97–104. ISSN 1547-6278, 1555-8592.
Dostupné z: doi:10.4161/org.5.3.9495
- [33] PEGG, David E., Monica C. WUSTEMAN a Serena BOYLAN. Fractures in Cryopreserved Elastic Arteries. *Cryobiology* [online]. 1997, **34**(2), 183–192. ISSN 00112240.
Dostupné z: doi:10.1006/cryo.1996.1997
- [34] ŠPAČEK, Miroslav, Pavel MĚŘIČKA, Libor JANOUŠEK, Petr ŠTÁDLER, Miloš ADAMEC, Robert VLACHOVSKÝ, Igor GUŇKA, Pavel NAVRÁTIL, Filip THIEME, Rudolf ŠPUNDA, Jan BURKERT, Robert STAFFA, Petr NĚMEC a Jaroslav LINDNER. Current vascular allograft procurement, cryopreservation and transplantation techniques in the Czech Republic. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* [online]. 2019, **28**(4), 529–534. ISSN 1899-5276.
Dostupné z: doi:10.17219/acem/90037
- [35] MACRAE, Rylea A., Karol MILLER a Barry J. DOYLE. Methods in mechanical testing of arterial tissue: a review. *Strain*. 2016, (52.5), 380–399.
- [36] BURKERT, Jan, Petra KOCHOVÁ, Zbyněk TONAR, Robert CIMRMAN, Tereza BLASSOVÁ, Ramadan JASHARI, Radovan FIALA a Jaroslav ŠPATENKA. The time has come to extend the expiration limit of cryopreserved allograft heart valves. *Cell and Tissue Banking* [online]. 2021, **22**(2), 161–184. ISSN 1389-9333, 1573-6814.
Dostupné z: doi:10.1007/s10561-020-09843-2
- [37] ŠKORPÍKOVÁ, Terezie. *Konstitutivní modelování žilní stěny*. Praha, 2020. Diplomová práce. ČVUT v Praze, Fakulta strojní.
- [38] MICHALEC, Jiří, ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE, a STROJNÍ FAKULTA. *Pružnost a pevnost I*. Praha: České vysoké učení technické, 2009. ISBN 978-80-01-04224-3.



- [39] VIMROVÁ, Anežka. *Vliv kryogenního skladování na mechanické vlastnosti cévních štěpů při kvazistatickém zatěžování*. Praha, 2019. Bakalářská práce. ČVUT v Praze, Fakulta strojní.
- [40] VENKATASUBRAMANIAN, Ramji T., Wim F. WOLKERS, Mithun M. SHENOI, Victor H. BAROCAS, Daniel LAFONTAINE, Charles L. SOULE, Paul A. IAIZZO a John C. BISCHOF. Freeze–Thaw Induced Biomechanical Changes in Arteries: Role of Collagen Matrix and Smooth Muscle Cells. *Annals of Biomedical Engineering* [online]. 2010, **38**(3), 694–706. ISSN 0090-6964, 1573-9686. Dostupné z: doi:10.1007/s10439-010-9921-9
- [41] NOVOTNY, Robert, Pavel MERICKA, Jaroslav CHLUPAC, Roman MATEJKA, Jakub KRISTEK, Tomas MARADA, Miroslav KONARIK, Peter IVAK, Lubomir STERBA, Jaroslav HLUBOCKY, Jan PIRK, Libor JANOUSEK a Jiri FRONEK. The Effect of Different Thawing Rates on Cryopreserved Human Iliac Arteries Allograft's Structural Damage and Mechanical Properties. *BioMed Research International* [online]. 2020, **2020**, 1–7. ISSN 2314-6133, 2314-6141. Dostupné z: doi:10.1155/2020/6545190
- [42] NOVOTNY, Robert, Dasa SLIZOVA, Jaroslav HLUBOCKY, Otakar KRS, Jaroslav SPATENKA, Jan BURKERT, Radovan FIALA, Petr MITAS, Pavel MERICKA, Miroslav SPACEK, Zuzana HLUBOCKA a Jaroslav LINDNER. Cryopreserved human aortic root allografts arterial wall: Structural changes occurring during thawing. *PLOS ONE* [online]. 2017, **12**(4), e0175007. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0175007
- [43] ŠPAČEK, Miroslav, Pavel MĚŘIČKA, Libor JANOUŠEK, Markéta DALECKÁ, Aleš BENDA, Otakar KRS, Dáša SLÍŽOVÁ, Rudolf ŠPUNDA, Jan HRUBÝ, Ivan MATIA, Barbora HONEGROVÁ a Jaroslav LINDNER. Comparison of Different Thawing Protocols in Human Cryopreserved Venous Grafts. *Annals of Vascular Surgery* [online]. 2020, **64**, 347–354. ISSN 08905096. Dostupné z: doi:10.1016/j.avsg.2019.11.026
- [44] KOHN, Julie C., Marsha C. LAMPI a Cynthia A. REINHART-KING. Age-related vascular stiffening: causes and consequences. *Frontiers in Genetics* [online]. 2015, **06** [vid. 2022-05-25]. ISSN 1664-8021. Dostupné z: doi:10.3389/fgene.2015.00112



2022